

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б.Н. ЕЛЬЦИНА»

*На правах рукописи*

Ковалев Сергей Юрьевич

**ПРОИСХОЖДЕНИЕ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ  
ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук  
03.02.02 – вирусология

ЕКАТЕРИНБУРГ - 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	5
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ .....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. Общая характеристика вируса клещевого энцефалита.....	18
1.2. Географическое распространение субтипов ВКЭ, проблемы генетической идентификации штаммов и методы типирования вируса .....	26
1.2.1. Географическое распространение субтипов ВКЭ.....	26
1.2.2. Проблема кросс-контаминации и (или) лабораторных ошибок при работе с клещевыми флавивирусами .....	32
1.2.3. Молекулярно-генетические методы генотипирования ВКЭ.....	35
1.3. Иксодовые клещи как основные хозяева и переносчики ВКЭ .....	38
1.3.1. Жизненный цикл клещей и пути передачи вируса.....	38
1.3.2. Зоны симпатрии и репродуктивная изоляция видов клещей комплекса <i>I. ricinus</i> .....	41
1.4. Существующие представления об эволюции ВКЭ .....	46
1.5. Микроэволюционные процессы в популяциях РНК-содержащих вирусов .....	51
1.5.1. Основные понятия микроэволюции и её особенности у вирусов.....	51
1.5.2. Теория квазивидов .....	54
1.5.3. Дефектные интерферирующие частицы и комплементация.....	56
1.6. Концепции видообразования у вирусов.....	58
1.6.1. Филетический градуализм.....	58
1.6.2. Квантовое видообразование .....	59

1.6.3. Смена хозяина («host jump») как ведущий фактор видообразования вирусов .....	60
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	66
2.1. Материалы исследования .....	66
2.2. Методы исследования .....	67
2.2.1. Экстракция нуклеиновых кислот и обратная транскрипция.....	67
2.2.2. Амплификация ДНК.....	68
2.2.3. Клонирование и скрининг ПЦР-продуктов .....	75
2.2.4. Филогенетический анализ .....	76
2.2.5. Расчет скорости нуклеотидных замен и оценка времени дивергенции штаммов ВКЭ .....	76
2.2.6. Структурное моделирование молекул РНК и белков .....	78
ГЛАВА 3. ОТДЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВКЭ И ЭВОЛЮЦИИ КЛЕЩЕЙ <i>IXODES PERSULCATUS</i> НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ.....	79
3.1. Разработка типоспецифической ОТ-ПЦР и молекулярно - эпидемиологическая характеристика популяций ВКЭ на территории Среднего Урала .....	79
3.2. Происхождение и распространение вируса клещевого энцефалита ВКЭ-Сиб на Среднем Урале, в европейской части России и в Прибалтийских странах .....	84
3.3. Происхождение штаммов неэндемичных субтипов ВКЭ на территории бывшего СССР .....	99
3.3.1. Происхождение штаммов неэндемичных субтипов ВКЭ в ходе реализации Программы по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц .....	99
3.3.2. Проблема «смены» генотипа вируса клещевого энцефалита на Среднем Урале за последние 60 лет.....	108
3.4. Референсный штамм <i>Soffin</i> вируса клещевого энцефалита и проблема его аутентичности .....	112

3.5. Исследование генетической структуры клещей <i>I. persulcatus</i> как возможного фактора, определяющего генетическую изменчивость вируса.....	127
ГЛАВА 4. ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА И ЭВОЛЮЦИЯ ВКЭ.....	142
4.1. Кластеронная структура популяций ВКЭ .....	142
4.2. Кластероны как инструмент мониторинга популяций ВКЭ .....	154
4.3. Квантовая эволюция вируса клещевого энцефалита .....	166
4.4. Гибридизация клещей комплекса <i>I. ricinus</i> в природных популяциях в зонах их симпатрии.....	182
4.4.1. Гибридизация клещей <i>I. persulcatus</i> и <i>I. pavlovskyi</i> в симпатрических популяциях Западной Сибири.....	182
4.4.2. Гибридизация клещей <i>I. ricinus</i> и <i>I. persulcatus</i> в симпатрических популяциях на территории Эстонии.....	195
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	205
ВЫВОДЫ .....	208
БЛАГОДАРНОСТИ .....	210
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	211
ПРИЛОЖЕНИЕ I .....	255
ПРИЛОЖЕНИЕ II .....	257
ПРИЛОЖЕНИЕ III .....	263
ПРИЛОЖЕНИЕ IV .....	264
ПРИЛОЖЕНИЕ V .....	267
ПРИЛОЖЕНИЕ VI .....	269
ПРИЛОЖЕНИЕ VII .....	320
ПРИЛОЖЕНИЕ VIII .....	321
ПРИЛОЖЕНИЕ IX .....	322
ПРИЛОЖЕНИЕ X .....	323



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

ВКЭ-Дв – вирус клещевого энцефалита дальневосточного субтипа

ВКЭ-Ев – вирус клещевого энцефалита европейского субтипа

ВКЭ-Сиб – вирус клещевого энцефалита сибирского субтипа

ДИЧ – дефектная интерферирующая частица

дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфат

е.а. – единица активности

ед. – единица (ы)

ИПТГ – изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид

кДНК – комплементарная ДНК

ККЭ – комплекс клещевого энцефалита

КЛБ – киассанурская лесная болезнь

КЭ – клещевой энцефалит

ЛЗН – лихорадка Западного Нила

МГ – межвидовые гибриды

МГНК – молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот

МЗ – множественное заражение

мтДНК – митохондриальная ДНК

н.п. – нуклеотидные пары

нт – нуклеотид(ы)

НТО – нетранслируемая область

ОГЛ – омская геморрагическая лихорадка

ОРС – открытая рамка считывания

ОТ – обратная транскрипция

ПААГ – полиакриламидный гель

ПДРФ - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

рРНК – рибосомальная РНК

ШЭО – шотландский энцефаломиелит овец

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

яДНК – ядерная ДНК

d<sub>N</sub> – количество несинонимических нуклеотидных замен

d<sub>S</sub> – количество синонимических нуклеотидных замен

ITS2 – внутренний транскрибируемый спейсер 2 (internal transcribed spacer 2)

RACE – быстрая амплификация концов кДНК (rapid amplification of cDNA ends)

X-Gal – 5-бromo-4-хлоро-3-индолил-бета-D-галактопиранозид (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside)

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ

**Популяция** – генетически и экологически взаимосвязанная группировка особей вида, занимающая общую территорию, способная к длительному (сотни последовательных генераций) автономному существованию и относительно обособленная от других популяций.

**Популяция вируса** – совокупность отдельных клонов, которые образуют в бесчисленном ряду поколений нескрещивающиеся между собой между собой чистые линии.

**Локальная популяция** – это совокупность особей одного вида, имеющих общее местообитание и длительно существующих в определенной части ареала.

**Штамм** – лабораторная «фиксированная» культура вируса, адаптированная к размножению на лабораторных животных или в культурах клеток.

**Изолят (изолят РНК)** – РНК вируса, выделенная из природного материала – клещей, тканей животных, а также из клинических проб от больных или умерших людей без выделения штамма.

**Основной хозяин арбовирусов** – вид членистоногого животного, обеспечивающий непрерывную циркуляцию вируса в природе и связанный с ним коэволюционными связями.

**Резервуарный хозяин арбовирусов** – позвоночное животное, являющееся прокормителем членистоногого (основного хозяина вируса) и обеспечивающее вирусу возможность размножения и сохранения вне организма основного хозяина.

**Квазивиды** (quasispecies) – динамически распространяющиеся неидентичные, но тесно связанные мутантные вирусные геномы,

находящиеся в постоянном процессе генетических вариаций, конкуренции и селекции.

**Репродуктивный потенциал ( $R_0$ )** – условный показатель, отражающий способность популяции к размножению, выживанию и развитию при оптимальных экологических условиях, т. е. к увеличению численности при отсутствии лимитирующих факторов.

**Комплементация вирусов** – негенетическое взаимодействие двух вирусов, репродуцирующихся в одной и той же клетке, при котором белки одного вируса способствуют осуществлению определенного этапа репродукции другого вируса.

**Интрогрессия (introgression)** – включение генов одного вида в генный комплекс других видов при гибридизации (интрогрессивная гибридизация). В результате интрогрессии формируются плодовитые гибриды, способные к возвратному скрещиванию и дающие жизнеспособное потомство.

**Host jump (host switch)** – явление приобретения возбудителем способности распространяться в популяции нового хозяина/переносчика.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Широкое распространение, высокий риск инфицирования и тяжесть заболевания делают клещевой энцефалит (КЭ) одной из самых актуальных природно-очаговых вирусных инфекций в России. На территории России ежегодно регистрируется до 10 тыс. случаев КЭ. В европейской части страны заболевание протекает, как правило, в виде тяжелой лихорадки, тогда как в азиатской части часто встречаются менингеальные, менингоэнцефалитические и очаговые формы КЭ. Известны также случаи хронических форм [156]. Летальность при КЭ колеблется в различных географических районах достаточно широко - от 0,03 до 20-35% [43]. Этиологическим агентом КЭ является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Основными переносчиками ВКЭ являются иксодовые клещи *I. ricinus* L. и *I. persulcatus* Schulze.

Для адекватного прогнозирования развития эпидемической ситуации и оценки тенденций в развитии региональных особенностей клинических проявлений заболевания в современных условиях становится крайне актуальным перманентный мониторинг генетической структуры природных популяций ВКЭ. Очевидно, что для этого необходима надежная и информативная система дифференциации штаммов в пределах субтипа ВКЭ, позволяющая изучать вопросы, связанные с происхождением и поддержанием природных очагов КЭ, динамикой изменения генетической структуры популяций ВКЭ, антропогенным и другими воздействиями на биоценоз, а также позволяющая предсказать появление новых эпидемически важных вариантов ВКЭ.

Вопросы эволюции ВКЭ до настоящего времени остаются открытыми. Так, на основе филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей генома или его фрагментов (ген E) были выдвинуты

три взаимоисключающие – как по направлению распространения по территории Евразии, так и по времени происхождения – гипотезы эволюции ВКЭ [56, 168, 304]. Очевидно, что разрешение возникшего противоречия возможно путем создания единой гипотезы эволюции ВКЭ, которая опиралась бы не только на данные филогенетики, но и учитывала интегральные знания об особенностях экологии и биологии вируса, ко-эволюции вируса и членистоногого хозяина.

Накопленный к настоящему времени значительный материал по географическому распространению генетических вариантов ВКЭ, а также других клещевых флавивирусов требует рационального объяснения их появления на неэндемичных территориях. Учет возможных факторов, обеспечивающих их распространение, является приоритетной задачей молекулярной эпидемиологии ВКЭ. Однако, нельзя исключать и то, что в отдельных случаях обнаружение таких вирусов может быть обусловлено человеческим фактором, а именно кросс-контаминацией и (или) лабораторными ошибками при работе с вирусами или их генетическим материалом. Выявление и учет таких случаев необходим для получения реального представления о границах ареалов субтипов ВКЭ и их отдельных филогенетических линий.

### **Степень разработанности темы исследования**

Современная классификация ВКЭ, основанная на филогенетическом анализе последовательностей генома, выделяет три субтипа: европейский (ВКЭ-Ев), переносчиком которого является клещ *I. ricinus*, сибирский (ВКЭ-Сиб) и дальневосточный (ВКЭ-Дв) с переносчиком *I. persulcatus* [30]. Также некоторые исследователи предполагают существование четвертого (штамм 178-79) и пятого (группа штаммов «886-84») субтипов, выделенных на территории Восточной Сибири в районе озера Байкал [15]. Показано, что

каждый субтип обладает собственным ареалом, хотя штаммы всех трех субтипов встречаются с той или иной частотой и в других регионах [1, 26, 54, 191, 195, 302]. Большинство штаммов ВКЭ (75%), выделенных на территории России, относятся к сибирскому субтипу [26], в составе которого выделяют две филогенетические линии: Балтийскую и Сибирскую [147].

Для объяснения вопросов эволюции и распространения генетических вариантов ВКЭ выдвинут ряд гипотез [56, 168, 304], однако все они основаны на модели молекулярных часов и не учитывают их возможную неравномерность, а также роль коэволюционных процессов. Тем не менее, показано, что возникновение новых вирусов или их генетических вариантов часто связано с переходом вируса на новый вид хозяина («host-jump»). Общеизвестными примерами являются вирус гриппа [268] или вирус тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV [208]. Анализ имеющихся литературных данных дает основания предполагать, что «host-jump» может являться ключевым фактором в эволюции вирусов.

**Цель исследования:** разработать систему классификации вируса клещевого энцефалита в пределах субтипа и на основе комплексного подхода предложить гипотезу о времени происхождения, путях распространения и механизмах эволюции ВКЭ.

**Задачи исследования:**

1. Разработать систему дифференциации ВКЭ в пределах субтипа;
2. Определить факторы, влияющие на распространение ВКЭ в локальном и глобальном масштабе;
3. Предложить методологические подходы эффективного мониторинга ВКЭ в природных очагах;
4. Установить филогеографическую структуру популяций таежного клеща *I. persulcatus* на основе анализа последовательностей фрагментов ядерной и митохондриальной рРНК;

5. Изучить популяции близкородственных видов иксодовых клещей в зонах симпатрии для выявления межвидовых гибридов;

6. Установить основные факторы, определяющие эволюцию ВКЭ, и предложить наиболее вероятный сценарий эволюционной истории ВКЭ;

7. Установить значение кросс-контаминации и (или) лабораторных ошибок в работе с клещевыми флавивирусами на примере референсного штамма *Soffin*. Обосновать необходимость генетической паспортизации коллекционных и вакцинных штаммов.

### **Научная новизна**

На примере ВКЭ сибирского субтипа впервые показано, что решающим фактором в распространении вируса на территории России является хозяйственная деятельность человека, связанная с процессами колонизации Урала и Сибири с начала XVII века.

Впервые показано, что антропогенный фактор может оказывать прямое влияние на формирование генетической структуры популяций ВКЭ как в прошлом, так и в настоящем, например, при реализации долгосрочной Всесоюзной программы по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц, действовавшей с 30-х по 1991 год прошлого века.

Впервые предложена система дифференциации ВКЭ в пределах субтипа, основанная на выделении элементарной структурной единицы вирусной популяции – кластерона. Данный подход позволил эффективно классифицировать природные очаги как по количеству, так и по размеру кластеронов, и тем самым заложить основы для постоянного комплексного мониторинга эпидемиологической и эпизоотологической ситуации.

Применение кластеронного подхода для анализа популяций ВКЭ на территории Среднего Урала впервые позволило дать исчерпывающую генетическую характеристику популяций ВКЭ в данном регионе. Была показана филогеографическая связь между популяциями ВКЭ различных природных очагов, установлены механизмы их формирования.



Впервые расшифрован полный геном аутентичного референсного штамма *Sofjin* (ВКЭ-Дв), выделенного в 1937 году первой Дальневосточной экспедицией под руководством проф. Л.А. Зильбера.

Впервые показана ошибочность представлений о высокой генетической изменчивости популяций *I. persulcatus* таежной зоны России на уровне генов рРНК, что указывает на непригодность данных генетических маркеров для выявления генетически различных популяций клещей и изучения процессов формирования их коэволюционных связей с ВКЭ.

Впервые показана возможность существования в зонах симпатрии гибридов близкородственных видов клещей рода *Ixodes* – основных хозяев ВКЭ и возбудителей других природно-очаговых инфекций.

Выдвинута новая гипотеза, позволяющая объяснить широкий круг вопросов, касающихся механизмов распространения и эволюции ВКЭ.

### **Практическая и теоретическая значимость работы**

Настоящая работа является первым комплексным исследованием, позволяющим прояснить вопросы происхождения, распространения и эволюции ВКЭ. Филогеографический и временной анализ большого количества нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е штаммов ВКЭ, выделенных в ходе выполнения данной работы на территории Урала, Сибири, Северо-запада России, а также представленных в GenBank, показал, что в основе распространения и формирования природных очагов КЭ лежит антропогенный фактор, а не естественные причины, как было принято считать ранее.

Показана принципиальная возможность выделения отдельных групп штаммов ВКЭ («кластеронов») на основе идентичности аминокислотной последовательности фрагмента гликопротеина Е вируса и типу территориального распределения штаммов.

Разработана и успешно применена система перманентного

мониторинга популяций ВКЭ в природных очагах Среднего Урала на основе кластерного подхода.

Определены нуклеотидные последовательности фрагмента генома (фрагмент гена E) 500 штаммов ВКЭ сибирского и дальневосточного субтипов (номера доступа в GenBank GU339055, GU444122-GU444286, HM008973-HM008985, JX315719- JX316000).

Определена полная нуклеотидная последовательность генома аутентичного референсного штамма ВКЭ *Soffin* дальневосточного субтипа, выделенного в 1937 году первой Дальневосточной экспедицией под руководством проф. Л.А. Зильбера (номер доступа в GenBank DQ486861).

Показано, что близкородственные виды иксодовых клещей в зонах их симпатрии образуют гибридные популяции, которые, как предполагается, могут играть важную роль в эволюции ВКЭ, выступая в качестве переходного звена при смене вирусом членистоногого хозяина.

Материалы исследований были использованы при подготовке программ курсов лекций «Молекулярная генетика» и «Биоинформатика» биологического факультета УрФУ им. Б.Н. Ельцина.

### **Методология и методы исследования**

Методология исследования включала в себя использование общенаучных методов познания и комплексного подхода к изучению проблем эволюции вируса клещевого энцефалита. Для выполнения исследования были использованы общепринятые методы сбора клещей и молекулярно-генетического анализа (выделение нуклеиновых кислот, ПЦР, секвенирование ДНК, филогенетический анализ). Для анализа полученных данных были применены оригинальные методы и подходы, разработанные непосредственно соискателем: 1) кластерный подход как метод дифференциации штаммов ВКЭ в пределах субтипа 2) мониторинг природных очагов клещевого энцефалита на основе анализа кластерной

структуры вируса; 3) Выявление гибридов близкородственных видов иксодовых клещей методом ПЦР в реальном времени.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Дифференциация штаммов ВКЭ на группы (кластероны) по идентичности аминокислотной последовательности фрагмента гликопротеина Е и типу их территориального распределения позволяет предложить классификацию ВКЭ в пределах субтипа.

2. Антропогенный фактор (хозяйственная деятельность человека) является решающим в распространении ВКЭ и формировании очагов КЭ как в прошлом, так и в настоящем.

3. В пределах субтипа ВКЭ кластероны могут быть представлены в виде кластеронной структуры, пространственно-временной анализ которой позволяет проводить эффективный мониторинг очагов КЭ.

4. Субтипы ВКЭ произошли в ходе квантовой эволюции путем преодоления вирусом межвидового барьера близкородственных видов иксодовых клещей (основных хозяев). В основе квантовой эволюции ВКЭ лежат три феномена: высокая скорость нуклеотидных замен при репликации вирусного генома, комплементация и гибридизация близкородственных видов клещей в зоне симпатрии.

5. Близкородственные виды клещей комплекса *I. ricinus* в зоне симпатрии способны к гибридизации и формированию популяций, состоящих из гибридов первого поколения, а также гибридов с разным уровнем интрогрессии ядерной ДНК.

6. Филогеографическая структура клеща *I. persulcatus* является самой гомогенной из всех иксодовых клещей комплекса *I. ricinus*; гены рРНК непригодны для выявления генетически различных популяций данного вида и изучения процессов формирования его коэволюционных связей с ВКЭ.

7. Штаммы ВКЭ, депонированные в вирусных коллекциях, а также

используемые при производстве вакцин, нуждаются в обязательной генетической паспортизации с целью устранения возможной контаминации и (или) лабораторной ошибки.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных в ходе работы данных определяется достаточным числом исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных методов.

Материалы диссертации были представлены на научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М.П. Чумакова (Москва, 2009), на региональных научно-практических конференциях (Екатеринбург, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011), на всероссийских научно-практических конференциях с международным участием (Москва, 2004, 2007, 2011, 2013; С.-Петербург, 2005, 2012, 2013, 2014; Новосибирск, 2005; Екатеринбург, 2006, 2009; Омск, 2007, 2011, 2014; Н.-Тагил, 2008, 2012; Волгоград, 2010), на международных конференциях по проблемам инфекционных заболеваний (С.-Петербург, 2008), по развитию научных исследований и надзору за инфекционными заболеваниями (С.-Петербург, 2010), по новым подходам к вакцинации против клещевого энцефалита (ISW-TBE Вена-Австрия, 2011), по проблемам природно-очаговых болезней, посвященной 75-летию открытия вируса клещевого энцефалита (Иркутск-Листвянка, 2012).

По теме диссертации опубликовано 12 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 3 – в российских и 9 – в зарубежных изданиях, цитируемых в базах Web of Science и Scopus, глава в коллективной монографии и 20 статей в сборниках научных конференций.

### **Место выполнения работы и личный вклад автора**

Все лабораторные исследования были проведены на базе лаборатории молекулярной генетики Института естественных наук ФГАОУ ВПО «Уральского федерального университета им. первого Президента РФ Б.Н. Ельцина». Образцы клещей и (или) их пулов были получены в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области», а также собраны лично автором и сотрудниками лаборатории молекулярной генетики УрФУ. Штаммы ВКЭ получены в ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций (ЕНИИВИ) Роспотребнадзора». Основные результаты получены лично автором, которым была генерирована идея исследования, сформулированы цели, задачи и выводы. Самостоятельно проведено большинство лабораторных исследований, анализ и интерпретация полученных результатов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 323 страницах машинописного текста, из них 68 - приложения, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов и списка литературы, который включает 305 наименований, в том числе 76 отечественных и 229 зарубежных авторов. Работа содержит 15 таблиц, иллюстрирована 39-ю рисунками и 10-ю приложениями.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая характеристика вируса клещевого энцефалита

Согласно IX доклада Комитета по таксономии вирусов Международного общества микробиологов [194], семейство *Flaviviridae* состоит из трех родов: *Flavivirus* (53 вируса), *Pestivirus* (4 вируса) и *Hepacivirus* (1 вирус - 7 генотипов). Кроме того, к этому семейству относят неклассифицированные вирусы, чья видовая самостоятельность пока не доказана. Представители всех родов этого семейства близки по строению вирионов, содержат липидную оболочку и схожи по организации генома, но при этом антигенно не связаны между собой.

В отличие от пестивирусов и вируса гепатита С, флавивирусы в основном являются арбовирусами, многие из которых вызывают серьезные заболевания человека и домашних животных. Практически ежегодно публикуются работы, посвященные выделению новых флавивирусов [151, 228, 243], в том числе вирусов комаров [113, 133, 179, 196, 236, 266].

Ранняя систематика флавивирусов была основана на их антигенном родстве, а также на общих эпидемических, патогенетических и экологических характеристиках. В настоящее время классификация флавивирусов основана на филогенетическом анализе полных геномов или их фрагментов.

Основываясь на данных современных филогенетических исследований, флавивирусы делят на три основные группы, ассоциированные с членистоногими переносчиками: клещевые, комариные и флавивирусы с неустановленным переносчиком. Помимо этих трех групп, к флавивирусам также относят небольшую группу вирусов насекомых. Клещевые флавивирусы в свою очередь подразделяют на две группы: вирусы, связанные с иксодовыми клещами (как правило, патогенны для человека), и вирусы, ассоциированные с клещами рода *Ornithodoros*, паразитирующих на морских птицах. Комариные флавивирусы подразделяют на ассоциированные с орнитофильными комарами рода *Culex* и с комарами рода *Aedes*,

предпочитающих в качестве прокормителей млекопитающих. Флавивирuses с неустановленным переносчиком делят на две группы, вирусы одной из которых циркулируют в грызунах, а другой – в летучих мышах [112, 144, 152, 153, 184].

Вирус клещевого энцефалита принадлежит роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и относится к группе клещевых флавивирусов, связанных с иксодовыми клещами, в которую также входят патогенные для человека вирус Омской геморрагической лихорадки (ОГЛ), вирус Лангат, вирус Шотландского энцефалита овец (ШЭО), вирус Киасанурской лесной болезни, вирус Алхурма и вирус Повассан.

ВКЭ встречается на обширной территории Евразии от Атлантического до Тихого океана в разных типах лесных и лесостепных экосистем. Ареал вируса совпадает с видовыми ареалами основных переносчиков – *Ixodes persulcatus* Schulze (1930) и *I. ricinus* L. (1758) [39, 42].

#### *Строение вириона. Геном вируса*

Вирион ВКЭ состоит из сферического рибонуклеокапсида, окруженного липопротеидной мембраной (рис. 1.1). Размер вирусной частицы составляет около 50 нм в диаметре, икосаэдрический нуклеокапсид имеет размеры около 30 нм. Геном представлен одноцепочечной РНК позитивной полярности, состоящей приблизительно из 11 тыс. оснований и кодирующей один полипротеин. Открытая рамка считывания (ОРС) полипротеина фланкирована нетранслируемыми областями (НТО). Длина 5'-НТО составляет около 130 нуклеотидов, а 3'-НТО – 400-700 нуклеотидов. РНК этих областей имеет выраженную вторичную структуру и, по всей вероятности, принимает участие в регуляции репликации генома и его упаковки в вирион [153, 157]. Полипротеин ВКЭ размером 3414 аминокислотных остатков (а.о.) подвергается посттрансляционной модификации с образованием 10 основных вирусных белков. Размер ОРС других флавивирусов незначительно колеблется от -10 до +8 а.о. Три вирусных белка являются структурными:

белок С (92 а.о.), который вместе с РНК формирует нуклеокапсид, и два поверхностных белка М (75 а.о.) и Е (496 а.о.), погруженные в вирусную мембрану вириона. Семь неструктурных белков – NS1 (353 а.о.), NS2A (229 а.о.), NS2B (131 а.о.), NS3 (621 а.о.), NS4A (126 а.о.), NS4B (252 а.о.) и NS5 (903 а.о.) – обеспечивают репликацию вирусного генома в клетке (рис. 1.2). При разрезании вирусного полипротеина образуются еще три коротких полипептида: СТНД (20 а.о.), Pr (89 а.о.) и 2К (23 а.о.). Полипептиды СТНД и Pr являются лидерными последовательностями для структурных белков С и М соответственно. Они определяют, по всей вероятности, транспортировку полипептидов внутри клетки и правильность сборки и созревания вириона. Полипептид 2К расположен между NS4A и NS4B в последовательности полипротеина.

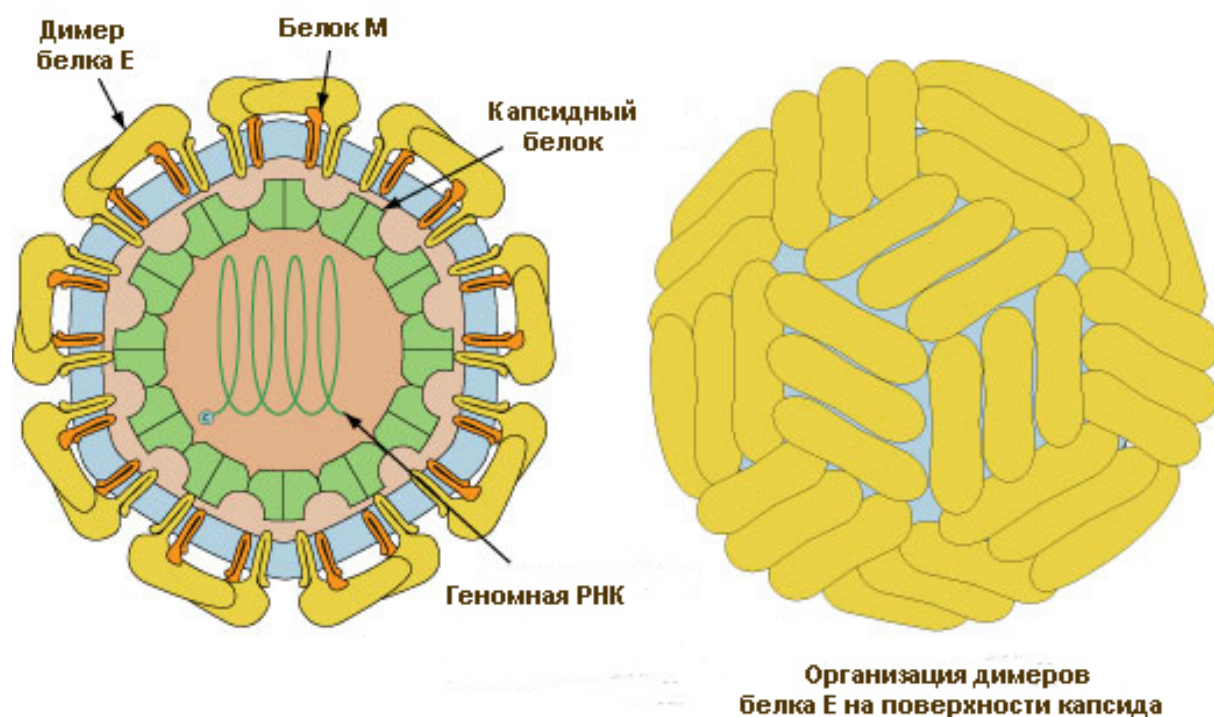


Рис.1.1. Строение вириона флавивирусов (<http://viralzone.expasy.org/>).



### *Нуклеокапсидный белок С*

Белок С – высокоосновный белок с мол. массой около 11 кДа, формирующий нуклеокапсид вириона [212]. Помимо структурной роли, белок С, вероятно, вовлечен в регуляцию репликации вирусной РНК [162]. В качестве строительного блока при сборке нуклеокапсида участвует димер белка С [187, 190, 215]. Заряженные аминокислотные остатки сгруппированы в основном на N и С концах и разделены коротким внутренним гидрофобным доменом, который опосредует связь этого белка с мембраной [212].

### *Мембранный белок М*

Мембранный белок существует внутри клеток в виде предшественника PrM с мол. массой 26 кДа, который транслоцируется в ЭПР за счет С-концевого трансмембранного домена [212]. Отщепление PrM от этого гидрофобного фрагмента происходит с помощью клеточной сигналазы только после того, как произойдет отщепление белка С. N-конец белка PrM содержит три сайта гликозилирования по N-типу и 6 консервативных цистеинов, которые участвуют в образовании дисульфидных связей [212]. Созревший белок М (8 кДа), состоящий из короткого внешнего домена (41 а.к.) и двух трансмембранных доменов, остается в составе вирионов, а гликозилированный фрагмент Pr секретируется из клетки.

### *Поверхностный гликопротеин Е*

Основной структурный мембранный белок Е (53-55 кДа) опосредует связывание флавивирусов с клеточными рецепторами, определяя тропизм и вирулентность вируса, а также обеспечивает образование вирус-нейтрализующих антител [261]. Структура белка Е консервативна среди всех флавивирусов [233, 234, 258, 286]. Белок Е синтезируется как мембранный белок первого типа, содержит 12 консервативных цистеинов, которые образуют дисульфидные связи [212]. Белок Е большинства флавивирусов, в том числе и ВКЭ, гликозилирован.

При физиологических значениях pH белок E формирует гомодимеры, располагающиеся параллельно липидной оболочке на внешней поверхности вирусных частиц [258]. Рентгеноструктурная модель белка E включает сформированный 1-395 аминокислотными остатками эктодомен, состоящий из двух трансмембранных сегментов и трех доменов.

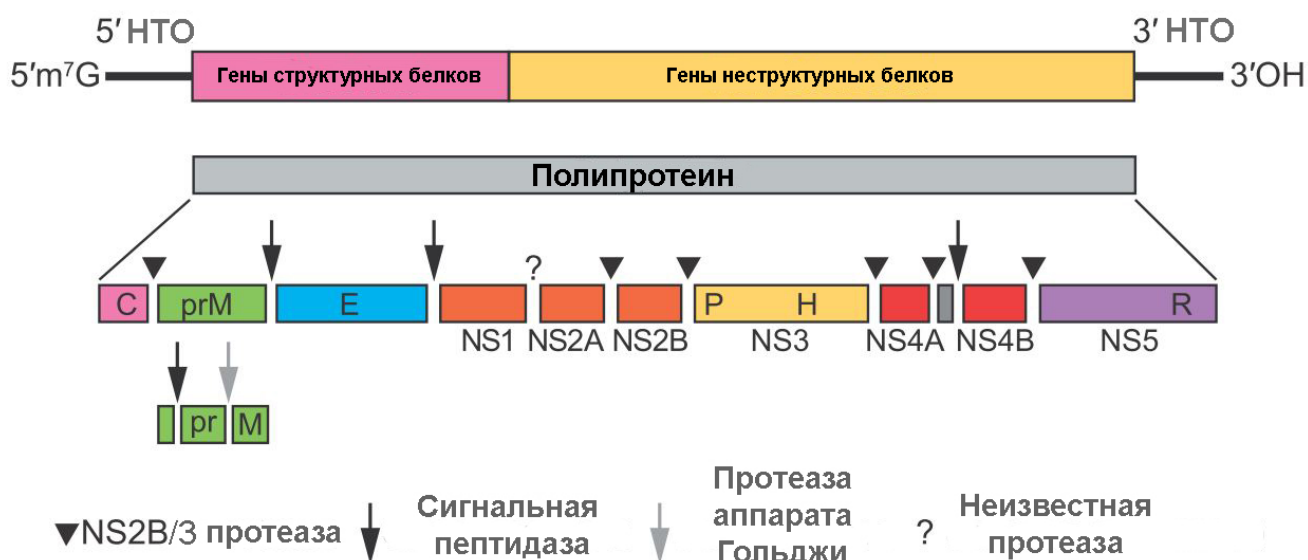


Рис. 1.2. Расположение генов вирусных белков в геноме флавивирусов и схема процессинга вирусного полипротеина [194]. Символами обозначены сайты, по которым происходит расщепление полипротеина клеточными (сигнальная пептидаза, фурин-подобный фермент в аппарате Гольджи) и вирусной протеазой NS2B/NS3

Центральный домен или **домен I** включает 1-51, 137-189, 285-302 а.о., формирующие структуру  $\beta$ -бочонка. Домен I образует антигенный район С [219]. **Домен II** формируется двумя выходящими из домена I петлями, у ВКЭ включает а.о. 52-136 и 190-284 и составляет антигенный район А [219]. Домен II содержит на своем наиболее удаленном конце жестко структурированную гидрофобную петлю (100-107 а.к. белка E у ВКЭ), непосредственно взаимодействующую с доменами I и III другой молекулы. Считается, что этот домен определяет гемагглютинирующую активность вируса. **Домен III**

гликопротеина Е ВКЭ включает а.о. 303-395 и образует антигенный район В [219]. Он участвует в формировании димерного контакта, образуя тройственный контакт с доменом II второй молекулы, входящей в состав димера, и доменом I собственной молекулы. Домен III участвует в связывании со специфическим рецептором [96, 165, 217]. Показано, что все три домена могут участвовать в связывании с ко-рецепторами [222].

Аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с моноклональными антителами, экспонированы на поверхности белка Е. Кросс-реактивные эпитопы находятся в антигенном районе А (домене II), тогда как тип- и субтип-специфичные расположены на других доменах [219, 258].

Наиболее известные генетические маркеры этого белка включают следующие аминокислотные мотивы: а) высококонсервативный для флавивирусов пептид слияния DRGWGNHCGXFGKG (позиция 98-111 а.о. белка Е), который обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембран [81]; б) 12 остатков цистеина в позициях 3, 30, 60, 74, 92, 105, 116, 121, 186, 290, 307 и 338 белка Е, которые формируют внутримолекулярные дисульфидные связи и консервативны для всех штаммов ВКЭ [245]; в) 3 потенциальных N-X-T/S сайта гликозилирования в позициях 154-156, 361-363 и 473-475 [102]. Нуклеотидная последовательность, соответствующая N-концу белка Е, весьма вариабельна и поэтому часто используется для генотипирования штаммов ВКЭ и проведения дифференциальной генетической диагностики КЭ.

### *Неструктурный белок NS1*

Белок NS1 (46-51 кДа) содержит 12 консервативных остатков цистеина, 1-3 сайта N-гликозилирования и несколько высоко консервативных для флавивирусов участков. Белок NS1 образует прочные димеры или гексамеры и имеет три формы: внутриклеточную, секретируемую и связанную с клеточной мембраной.

Внутриклеточная форма, как полагают, играет определенную роль в синтезе негативной цепочки вирусной РНК и таким образом входит в состав репликативного комплекса флавивирусов [212]. Функции связанной с мембранами и секретируемой форм белка NS1 не выяснены, однако способность этого белка экспонироваться на поверхности плазматической мембраны клетки и секретироваться во внеклеточное пространство дает основания предполагать его возможную роль в выполнении сигнальных и иммуномодулирующих функций. В общем случае в процессе флавивирусной инфекции характерно образование антител к белку NS1, обладающих способностью связывать факторы системы комплемента [260].

### *Неструктурный белок NS2a*

Небольшой гидрофобный белок NS2a с мол. массой 18-22 кДа пронизывает мембрану ЭПР 4-5 раз, несет дополнительный внутренний сайт разрезания вирусной протеазой, при расщеплении по которому образуется укороченная форма NS2A $\alpha$  (~20 кДа) [212]. Белок NS2A специфически связывается с 3'-НТО и совместно с белками NS3 и NS5, которые независимо связываются с тем же регионом РНК, образует репликативный комплекс [216, 282].

### *Неструктурный белок NS2b.*

Гидрофобный белок NS2b необходим для проявления протеазной активности неструктурного белка NS3, кроме того, предполагается, участие этого белка (наряду с другими неструктурными белками флавивирусов) в ингибировании синтеза интерферона- $\alpha$  [212, 213].

### *Неструктурный белок NS3*

Белок NS3 – второй по величине неструктурный белок вируса (68-70 кДа), имеет несколько функций [212]: 1) при связывании с NS2b обладает протеазной активностью и обеспечивает процессинг вирусного полипротеина; 2) обладает хеликазной активностью, которая, по-видимому, требуется для раскручивания репликативной формы РНК; 3) обладает нуклеозидтрифосфатазной активностью, которая, как предполагается, требуется на первой стадии кэпирования вирусной геномной РНК [282].

### *Неструктурный белок NS4a*

Белок NS4a (16 кДа) является интегральным мембранным белком, который, предположительно, соединяет белок NS1 с другими компонентами репликативного комплекса и обеспечивает связь белков репликативного комплекса с мембраной [210, 216, 282]. Предполагают, что NS4a участвует в ингибировании передачи сигнала интерферонов [213, 240].

### *Неструктурный белок NS4b*

Функциональная роль самого большого из мелких гидрофобных вирусных белков (27 кДа) не ясна. Показана его локализация в цитоплазме и клеточном ядре [282]. Предполагают, что он участвует в ингибировании передачи сигнала интерферонов [213, 240].

### *Неструктурный белок NS5*

Белок NS5, самый большой (103 кДа) и наиболее консервативный из всех белков флавивирусов, является РНК-зависимой РНК-полимеразой, а также обладает метилтрансферазной активностью и, таким образом, участвует в образовании структуры кэпа на 5' конце вирусной РНК [211].

## **1.2. Географическое распространение субтипов ВКЭ, проблемы генетической идентификации штаммов и методы типирования вируса**

### ***1.2.1. Географическое распространение субтипов ВКЭ***

Формирование знаний о современной генетической структуре ВКЭ имеет богатую и многолетнюю историю. Последовательность меняющихся представлений о филогеографической изменчивости ВКЭ по мере накопления генетических данных о различиях отдельных групп штаммов вируса хорошо описана [8, 27].

Современная классификация ВКЭ, основанная на филогенетическом анализе последовательностей генома, выделяет три основных субтипа: дальневосточный (ВКЭ-Дв), европейский (ВКЭ-Ев) и сибирский (ВКЭ-Сиб) [129, 149, 194]. Преимущественная циркуляция ВКЭ-Дв штаммов установлена для российского Дальнего Востока (Приморский и Хабаровский края, Сахалинская область), Японии и Северо-восточной части Китая. В Сибири, на Урале, а также европейской части территории России установлено абсолютное доминирование штаммов ВКЭ-Сиб. Западнее, на территории Восточной и Западной Европы, преобладают штаммы ВКЭ-Ев. Таким образом, каждый из генотипов обладает собственным ареалом, хотя штаммы всех трех генотипов встречаются с той или иной частотой и в других регионах [26].

Помимо трех основных субтипов, некоторые исследователи полагают, что существует еще как минимум два субтипа ВКЭ. Основываясь на уровне

генетических различий между штаммами трех основных субтипов и штаммами, выделенными на территории Восточной Сибири в районе озера Байкал, были выделены четвертый (представлен единственным штаммом 178-79) и пятый (группа штаммов «886-84») субтипы [15].

Отличительным признаком субтипа является маркерная аминокислота в позиции 206 гликопротеина Е. Для каждого субтипа ВКЭ характерна географическая привязанность к территории, которая отражена в его названии. Классификация штаммов ВКЭ в пределах субтипа в настоящее время не разработана. Однако, предпринимались попытки дифференцировать ВКЭ-Сиб на основе особенностей структуры белка Е и географическом распределении штаммов. Так, одна группа исследователей выделяла *азиатскую* и *восточно-европейскую* группы штаммов, основываясь на присутствии аминокислоты His, Gln или Tyr в позиции 234 гликопротеина Е [36]. Другая группа подразделяет ВКЭ-Сиб на две группы: *балтийскую* и *сибирскую*, либо по наличию Asn или Thr в позиции 175, либо Ala или Thr в позиции 313 белка Е. «Балтийские» штаммы встречаются в странах Прибалтики и Европейской части России, а «Сибирские» – на территории Западной и Восточной Сибири [147]. Приведенные выше подходы показывают возможность использования отдельных аминокислотных замен в качестве филогенетических маркеров, однако они оказались малоинформативными вследствие низкого разрешения.

Как было отмечено выше, каждый из трех субтипов ВКЭ имеет выраженную географическую приуроченность к определенным регионам лесной и таежной зон Евразийского континента, т.е. является эндемичным для этих территорий. Однако, многими исследователями отмечаются факты обнаружения субтипов ВКЭ на неэндемичных для них территориях. Наиболее ярким примером этого феномена являются многочисленные находки

штаммов ВКЭ-Дв на территории Западной Сибири, Урала, Европейской части России, а также Украины, Эстонии и Латвии во второй половине XX века [1, 54]. При этом, начиная с 90-х годов прошлого столетия, случаев выявления штаммов ВКЭ-Дв, подтвержденных секвенированием, не зарегистрировано. Отрицательная динамика частоты встречаемости ВКЭ-Дв на неэндемичных территориях в течение последних десятилетий послужила основой для выдвижения гипотезы «О смене генотипа ВКЭ за последние 60 лет» [54].

Особый интерес исследователей вызывают недавние случаи выделения на протяжении нескольких лет штаммов ВКЭ-Ев на территории Южной Кореи [191, 195, 302]. Филогенетический анализ пяти нуклеотидных последовательностей гена Е, а в последствие и двух полногеномных последовательностей показал, что корейские штаммы вируса являются типичными представителями ВКЭ-Ев (идентичность с европейскими штаммами по нуклеотидной и аминокислотной последовательностям составляет 97% и 99% соответственно) [301, 303]. Кроме Южной Кореи, штаммы ВКЭ-Ев были выделены также на территории Западной (пять штаммов из Алтайского края) и Восточной Сибири (восемь штаммов из Иркутской области). Штаммы ВКЭ-Ев, выделенные в Западной Сибири, показали высокий уровень идентичности последовательностей гена Е как между собой (>99%), так и со штаммом Абсеттаров (99%), который был выделен в Ленинградской области в 1951 году [58].

Ареал ВКЭ-Сиб – самый обширный из трех субтипов ВКЭ, однако, он не ограничивается на западе странами Балтии и Финляндии, как было принято считать ранее. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е трех штаммов ВКЭ, выделенных из клещей в Боснии и Герцеговине, показал, что они принадлежат ВКЭ-Сиб [1]. Данная находка существенно расширяет западные границы ареала этого субтипа. Восточная часть ареала ВКЭ-Сиб



простирается на всю Восточную Сибирь, однако имеются случаи выделения штаммов ВКЭ-Сиб на Дальнем Востоке [25]. Крайней восточной границей распространения ВКЭ-Сиб является остров Русский (Приморский край), где в 2012 году были выделено десять штаммов ВКЭ-Сиб с высоким уровнем гомологии со штаммом *Aina*, достигающим у некоторых из них 100%. [4].

Обнаружение флавивирусов вне пределов своих ареалов наблюдалось и для других вирусов комплекса клещевого энцефалита. Так, вирус Повассан, эндемичный для Северной Америки (восток Канады и северо-восток США), был выделен в семидесятых годах прошлого столетия на Дальнем Востоке (Приморский край) [207]. Анализ полных геномов дальневосточных штаммов вируса Повассан показал, что они на 99,8% идентичны штамму *LB*, который был выделен в Канаде в 1958 году из клинического материала. Примерно в эти же годы, опять же в Приморском крае, были выделены три штамма вируса ШЭО, нуклеотидные последовательности которых были более чем на 97% идентичны последовательностям штамма Негиши, выделенного в 1948 году в Японии (пригород Токио) [206]. Список примеров выделения штаммов клещевых флавивирусов на неэндемичных для них территориях может быть продолжен.

Подавляющее большинство исследователей полагает, что в основе этого явления лежит занос штаммов вируса с территорий их естественных ареалов. Однако, встречается и другая точка зрения, основанная на том предположении, что в некоторых случаях нетипичные для данной территории штаммы вируса на самом деле могут быть аборигенными, а их малочисленность объясняется процессом их замещения аллогенными вирусами. Так, например, ряд исследователей полагает, что на территории Западной Сибири, Урала и Европейской части России первоначально циркулировали штаммы ВКЭ-Дв, однако на протяжении последних 70 лет они

практически полностью были вытеснены штаммами ВКЭ-Сиб [38, 54]. Согласно предложенной гипотезе «О смене генотипа ВКЭ...», главной причиной столь масштабного явления могла быть, по мнению авторов, антропогенная трансформация природных ландшафтов, в результате которой ВКЭ-Сиб получил конкурентные преимущества над ВКЭ-Дв и со временем занял его экологическую нишу.

Существуют многочисленные версии и предположения относительно того, как штаммы вируса попали на неэндемичные для них территории, преодолев при этом расстояния во многие тысячи километров. Анализ научных источников на эту тему позволяет разбить их на две группы. К первой группе относятся естественные факторы, ко второй – причины, так или иначе связанные с деятельностью человека.

Наиболее часто встречается предположение о том, что занос штаммов ВКЭ на неэндемичные территории осуществляется благодаря естественным миграциям перелетных птиц, которые могут быть прокормителями иходовых клещей, а также временными носителями вируса. Так, например, новосибирские ученые полагают, что находки штаммов ВКЭ-Дв на территории Крыма могут быть связаны с переносом мигрирующими птицами зараженных вирусом клещей из Западной Сибири в районы бассейна Черного моря [232].

Другие исследователи предполагают, что основная причина заноса штаммов ВКЭ может быть следствием переселения человеком животных из мест их естественного обитания в новые регионы, например, с целью интродукции. Так, по мнению Алексеева А.Н., штаммы ВКЭ-Дв были занесены на территорию Крыма в результате завоза крупных промысловых млекопитающих с Дальнего Востока в охотничьи хозяйства Крыма [3].

Достаточно часто появление аллогенных штаммов ВКЭ или других вирусов ККЭ вообще не поддается рациональному объяснению, и в этом случае исследователи вынуждены приводить всевозможные предположения, которые хоть как-то могут пролить свет на этот феномен. Так, при попытке объяснить происхождение штаммов вируса Повассан на территории Приморского края были использованы следующие версии: а) естественные миграции птиц; б) транзит военных грузов и войск во время локальных и (или) мировых войн; в) интродукция животных, таких как ондатра и американская норка, с Американского континента на Дальний Восток России до и после Второй мировой войны и, наконец, г) гражданские морские грузоперевозки [207]. Однако, все эти предположения носят равновероятный характер, поскольку ни одно из них не имеет преимуществ перед другими.

Важно отметить, что аллогенные штаммы в большинстве примеров, приведенных выше, оказывались генетически близки как между собой, так и с прототипными штаммами, хранящимися в различных вирусологических коллекциях. Для штаммов ВКЭ-Ев этот факт некоторые исследователи объясняют особой стабильностью генома вирусов данного субтипа, который остается практически неизменным, например, у Алтайских и Иркутских штаммов, даже несмотря на то, что они находятся в условиях, кардинально отличающихся от их естественных экосистем, прежде всего по видовому составу переносчиков и прокормителей [58]. Существует и другая точка зрения, основанная на более чем 30-летнем наблюдении за вирусами Повассан и ШЭО в Приморском крае, согласно которой вирусы комплекса клещевого энцефалита могут быть занесены в новые биотопы, со сменой переносчиков и их хозяев, и при этом сформировать длительно существующие природные очаги без существенных изменений в вирусных геномах [7, 206].

Рядом ретроспективных исследований было показано, что в некоторых случаях факт заноса аллогенных штаммов был ошибочно установлен вследствие возможной кросс-контаминации или в результате лабораторных ошибок при работе с вирусами.

### **1.2.2. Проблема кросс-контаминации и (или) лабораторных ошибок при работе с клещевыми флавивирусами**

Для проведения иммунологических, молекулярно-генетических, эпидемиологических и клинических исследований принято использовать референсные культуры, в роли которых, как правило, выступают прототипные штаммы микроорганизмов и вирусов. Традиционно первые из выделенных штаммов патогенных вирусов *de facto* становились прототипными, т.е. служили эталонными образцами для последующих исследований. Часто такие штаммы становились основой для производства вакцин.

Особенностью прототипных штаммов вирусов, как правило, является их длительная (иногда на протяжении десятков лет) пассажная история, связанная с многочисленными пассажами на лабораторных животных или (и) культуре клеток, необходимыми для поддержания коллекции референсных штаммов. В результате может возникнуть кросс-контаминация и (или) лабораторная ошибка, следствием которой является замена одного штамма вируса другим.

В научной литературе, посвященной клещевым флавивирусам, время от времени публикуются статьи, в которых приводятся выявленные случаи кросс-контаминации и (или) лабораторных ошибок при работе с этими вирусами. Результатом этого является то, что заявленный штамм на самом деле является совершенно иным штаммом, а не потомком исходного,

возникшим вследствие генетической изменчивости из-за многочисленных пассажей.

В качестве примера можно привести вирус *Negishi*, выделенный в Японии во время вспышки Японского энцефалита в 1948 году от умершего больного в районе населенного пункта Negishi (район Токио). По антигенным характеристикам этот вирус оказался близок к клещевым, а не к комариным флавивирусам. Использование моноклональных антител к вирусу ШЭО выявил тесное антигенное родство между вирусом ШЭО и вирусом *Negishi*. Впоследствии гены, кодирующие гликопротеин Е вируса *Negishi* (штамм 3248/49/P10) и вируса ШЭО (штамм SB526), были секвенированы. Их сравнение выявило очень высокую гомологию на уровне нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Сравнительный анализ с известной последовательностью другого штамма вируса ШЭО (штамм 369/T2), а также с другими клещевыми флавивирусами показал, что вирус *Negishi* был более близок к вирусу ШЭО, чем любые другие клещевые вирусы [285]. В качестве возможного объяснения присутствия вируса ШЭО в Японии был предложен перенос инфицированных клещей птицами или овцами с Британских островов в Японию [285].

Так как впоследствии в Японии не было изолировано ни одного вируса ШЭО, то нельзя исключать возможности того, что вирус, вызвавший энцефалит в населенном пункте Negishi, был не вирусом ШЭО, а ошибочно идентифицирован как таковой, вследствие лабораторной кросс-контаминации лабораторным штаммом вируса ШЭО во время первоначальной характеристики оригинального вируса *Negishi*. Поскольку происхождение вируса *Negishi* является противоречивым и неопределенным, то его, по мнению ряда исследователей, следует исключать из филогеографического анализа [304].

Подобные случаи также описаны и в отношении других вирусов ККЭ. Так, например, в результате многолетней работы с аттенуированным штаммом ВКЭ-Ев *Hypr* – *Hy-NK* последующее секвенирование его генома обнаружило вместо исходного штамма вирус *Langat*, идентичный штамму *Langat E* [264].

Другой пример касается штамма вируса Киасанурской лесной болезни (КЛБ), выделенного в 1989 году в Китае, нуклеотидная последовательность генома которого была практически идентичной штамму *P9605* из Индии, несмотря на то, что их разделяет 32 года и 3 000 км. На основании этого было сделано предположение, что штамм из Китая не является аутентичным вирусным штаммом. Штамм вируса КЛБ *P9605* из Индии использовался в качестве референсного при анализе образцов сывороток в некоторых провинциях Китая и мог быть потенциальным источником лабораторной кросс-контаминации [229].

Считается доказанным, что кросс-контаминация имела место и в случае выделения в 1964 году в Западной Сибири (Тюменская область, Исетский район) штамма *Еланцев*, который был изолирован из крови человека, снявшего с себя напивавшегося клеща [18]. Данный штамм ВКЭ даже использовался для производства опытных партий живой клещевой вакцины, которая была испытана в Советском Союзе на сотнях тысяч человек [19]. Проведенные позднее исследования показали, что различия между нуклеотидными последовательностями фрагмента генома этого штамма и лабораторного штамма *Langat TP21* были минимальными [221].

Аналогичная ситуация произошла и со штаммом *Skalica*, выделенным в Чехословакии в 1976 от рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*), который изначально был определен как вирус клещевого энцефалита [154]. Вирус был не патогенен для белых мышей и по своим иммуногенным характеристикам

был даже рекомендован для производства инактивированной вакцины [155]. Однако проведенное впоследствии секвенирование фрагментов вирусного генома показало практически полную идентичность нуклеотидных последовательностей штамма *Skalica* с вирусом *Langat*, штамм *TP21* [158].

Как видно из приведенных выше примеров, проблема существования возможных кросс-контаминаций и (или) лабораторных ошибок при работе с вирусами является довольно распространенной и, как следствие, может приводить к ложным выводам и искажению научных представлений о распространении вирусов.

### **1.2.3. Молекулярно-генетические методы генотипирования ВКЭ**

Внедрение в вирусологические исследования методов молекулярной биологии позволило на основе объективных критериев получить новые данные о генетической структуре природных популяций вируса, как в пределах всего ареала, так и на отдельных территориях. Уже в 1986 году методом секвенирования нуклеиновых кислот по Сенгеру были получены первые нуклеотидные последовательности генома ВКЭ (штамм *Soffin*) [250]. Однако, в силу методических сложностей и дороговизны секвенирования этот метод был недоступен для изучения генетической изменчивости большого количества штаммов ВКЭ. В 1986 году для быстрого обнаружения ВКЭ в крови больных людей и в индивидуальных клещах был предложен достаточно информативный для того времени метод гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) [17]. В ходе дальнейших исследований [251] были отработаны подходы к идентификации вируса КЭ. Дифференциация штаммов вируса КЭ с помощью гибридизационного теста была осуществлена при использовании в качестве зондов синтетических дезоксирибоолигонуклеотидов [269]. Выбор зондов основывался на компьютерном анализе гомологии известных к тому времени нуклеотидных

последовательностей геномов вируса КЭ. Сначала тесты МГНК проводили с 12 дезоксирибоолигонуклеотидными зондами, из которых 10 были комплементарны различным участкам генома штамма *Soffin* (дальневосточный субтип), а два зонда - фрагментам генома штамма *Neudoerfl* (европейский субтип). Затем была использована панель, включающая по одному зонду на каждый из известных субтипов.

Метод МГНК сыграл важную роль в изучении генетической гетерогенности ВКЭ в 90-х годах прошлого столетия – с его помощью были получены данные по географическому распространению субтипов ВКЭ и обнаружены необычные генетические варианты ВКЭ (штамм 179-78 и группа штаммов 886-84). Однако, данный метод не получил широкого применения и к настоящему времени практически полностью утратил свое значение по целому ряду причин, а именно: неоднозначность получаемых результатов вследствие высокой изменчивости вирусного генома, необходимость использования радиоактивной метки, невозможность однозначно сравнить данные, полученные в разных лабораториях, трудоемкость и т.д.

Типирование вирусов с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) широко используется в мировой практике как для проведения эпидемиологических, так и клинических исследований [238, 287]. Так, еще в 2002 году был разработан способ экспресс-генотипирования штаммов ВКЭ с помощью ПДРФ [40], который впоследствии был усовершенствован [41]. В качестве мишени был выбран фрагмент гена Е (509 н.п.) расположенный в позициях 1255-1763 нуклеотидной последовательности генома штамма *Soffin*, в котором находятся сайты рестрикции эндонуклеазы *BstDEI*. В результате расщепления амплифицированного фрагмента генома данной эндонуклеазой для штаммов каждого субтипа образуется специфичный набор фрагментов различной



длины, который позволяет провести определение субтипа ВКЭ. В итоге проведенного ПДРФ-анализа для 46 из 49 проанализированных штаммов (94%) удалось провести типирование с помощью рестриктазы *BstDEI*, а нетипируемые этим методом штаммы должны были быть исследованы дополнительно с использованием эндонуклеазы *TspRI* или путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена E [41].

Альтернативный вариант ПДРФ-анализа для типирования ВКЭ был разработан другой группой ученых [31]. Для его проведения был выбран фрагмент гена E длиной 205 н.п., включающий маркерные аминокислоты в позициях 206 и 234. Данный участок обрабатывали тремя эндонуклеазами рестрикции *Asu2CI*, *Bst4CI*, *Hinfl*, в результате получали набор последовательностей ДНК различной длины, характерный для каждого генотипа. Специфичность данного варианта ПДРФ-анализа была подтверждена при параллельном типировании 60 штаммов с секвенированием участка гена E. Выявленные четыре пробы, не имеющие сайтов рестрикции ни для одной из рестриктаз, по результатам секвенирования были отнесены к сибирскому субтипу [31].

Хотя, по мнению разработчиков, предложенный подход определения субтипа ВКЭ позволяет достаточно быстро проводить скрининг большого массива штаммов, данный метод, несмотря на высокую специфичность и отсутствие необходимости прибегать к секвенированию пробы, имеет ряд ограничений. В частности, он неспособен выявить микст-штаммы (смесь штаммов ВКЭ, принадлежащих разным субтипам), в которых концентрации субтипов отличаются более чем в 10 раз.

Появление метода ПЦР в реальном времени сделало возможным проводить скрининг коллекций штаммов, полевого или клинического материала с наименьшими временными и трудовыми затратами. Так, в 2007 году

сотрудниками ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ, Москва, был разработан метод ПЦР-РВ с субтип-специфическими флуоресцентными зондами. Мишенью для праймеров и зондов являлся участок гена NS1 [33]. Следует отметить, что при типировании 270 образцов ВКЭ методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией было выявлено несколько несовпадений: два штамма имели три мутации в области посадки всех субтип-специфических зондов и поэтому не могли быть типированы данным способом, а три штамма ВКЭ из клещей *I. persulcatus* имели мутации в области посадки зондов для сибирского и дальневосточного субтипов, в результате чего были получены кривые роста флуоресценции измененной формы и с тем, и с другим зондом [80].

Описанные выше методы типирования ВКЭ позволяют в большинстве случаев установить принадлежность штамма к тому или иному субтипу, но надежно осуществить их дифференциацию внутри субтипа на филогенетические линии, кластеры и группы ВКЭ не представляется возможным, поэтому использование этих методов ограничено и в настоящее время не находит широкого применения.

Обнаружение штаммов ВКЭ, характеризующихся большим числом мутаций, особенно в области связывания праймеров и специфичных зондов, а также в сайтах рестрикции делает необходимым использование секвенирования в качестве единственного точного метода типирования.

### **1.3. Иксодовые клещи как основные хозяева и переносчики ВКЭ**

#### **1.3.1. Жизненный цикл клещей и пути передачи вируса**

Для поддержания ВКЭ в природе необходимы два типа хозяев: клещи, являющиеся основным хозяином и переносчиком вируса, и позвоночные животные, чья кровь является источником питания клещей и средством передачи ВКЭ от зараженного клеща к незараженному при их питании на

одном и том же животном [203]. Основными хозяевами и переносчиками ВКЭ являются клещи рода *Ixodes* и среди них виды комплекса *I. ricinus*. Эта группа включает 14 видов, обитающих в Евразии и Америке [134, 139, 298]. Из них в палеарктическую группу входят *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. pavlovskyi* Pomerantsev (1946), *I. kashmiricus* Pomerantzev (1948), *I. nipponensis* Kitaoka et Saito (1967) и *I. kazakstani* Olenov et Sorokoumov (1934) [66]. Наибольшее значение при этом имеют три вида клеща: собачий (лесной) клещ *I. ricinus*, таежный клещ *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*. Географическое распространение *I. ricinus* включает большие территории Европы и некоторые районы Северной Африки. *I. persulcatus* широко распространен в Евразии от стран Прибалтики на западе до северных территорий Японии. Природные очаги КЭ ассоциированы с вышеперечисленными переносчиками.

Основным хозяином, а также переносчиком ВКЭ-Ев является клещ *I. ricinus* [253], ВКЭ-Дв и ВКЭ-Сиб – *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*. Природные очаги КЭ не выходят за пределы естественной среды обитания этих трех видов иксодовых клещей. Тем не менее, на территории России ВКЭ был также обнаружен в других 18 видах клещей (например, в некоторых степных районах – в клещах *Dermacentor marginatus*), а иногда и в других кровососущих беспозвоночных, например, мухах, блохах и вшах [157].

Жизненный цикл клещей состоит из трех стадий развития: личинка, нимфа и имаго (половозрелая стадия). Для каждой стадии характерен свой круг позвоночных хозяев, на которых происходит питание, занимающее, как правило, несколько дней. Каждая стадия развития клещей рода *Ixodes* занимает примерно один год и должна обязательно завершиться кормлением на позвоночном животном. Таким образом, длительность жизненного цикла клеща составляет в среднем 3 года. Тем не менее, она может варьировать от 2 до 6 лет в зависимости от наличия хозяев и климатических условий.

Жизненный цикл клеща сопровождается двумя линьками. В результате первой линьки из личинки, имеющей шесть ног, развивается нимфа (восемь ног), которая от взрослой особи отличается меньшими размерами. В ходе второй линьки нимфа переходит в половозрелую стадию. Клеши могут передать вирус КЭ позвоночным хозяевам или человеку на всех стадиях своего развития.

Клеши могут заражаться ВКЭ на всех стадиях своего жизненного цикла, однако наличие вируса не вызывает патологических изменений. Вирус может передаваться от одной стадии развития клеща к последующей в результате трансфазовой передачи. В период, предшествующий линьке, вирус активно размножается и диссеминирует практически во все органы клеща [93]. ВКЭ может передаваться трансовариально, т.е. от инфицированной оплодотворенной самки к откладываемым ей яйцам [94], а также во время совместного питания клещей на одном и том же позвоночном хозяине [203, 204].

В течение многих лет считалось, что передача ВКЭ происходит тогда, когда неинфицированный клещ питается кровью инфицированного млекопитающего хозяина с развитой виремией. Хотя виремическая трансмиссия (передача), несомненно, имеет место и была много раз продемонстрирована экспериментально [257], она не могла удовлетворительно объяснить длительное поддержание клещевых флавивирусов в естественных условиях, поскольку у многих видов грызунов виремия не развивается. Альтернативным способом, обеспечивающим передачу вируса, стало открытие невиремической передачи клещевых буньявирусов, а затем и флавивирусов благодаря совместному питанию клещей на позвоночных хозяевах [188]. Невиремическая передача – это процесс, в результате которого вирус переходит от инфицированных к

неинфицированным клещам, питающимся рядом друг с другом на позвоночном хозяине. При этом не имеет значения, восприимчив ли позвоночный хозяин к вирусной инфекции и способен ли он к развитию виремии. Следствием такого процесса передачи вируса является существенное расширение спектра естественных хозяев, участвующих в передаче ВКЭ. Во время процесса питания инфицированного клеща вирус из слюнных желез попадает в дендритные клетки, которые свободно перемещаются под поверхностными слоями кожи. В процессе совместного питания неинфицированный клещ заражается при попадании зараженных дендритных клеток в слюнные железы в процессе питания. Было показано, что неvirемическая передача происходит и в естественных условиях, например, вируса ШЭО между инфицированным и неинфицированными иксодовыми клещами, совместно питающихся на зайцах-беляках (*Lepus timidus*) [188]. Открытие явления передачи вируса при совместном питании клещей на неvirемичных животных важно для понимания процессов эволюции и дисперсии клещевых флавивирусов.

### ***1.3.2. Зоны симпатрии и репродуктивная изоляция видов клещей комплекса *I. ricinus****

Тезис Павловского (1941) об организме переносчика как среде обитания для возбудителя в современной интерпретации можно понимать в том смысле, что иксодовые клещи оказывают значительное влияние на эволюцию патогенов [5]. В частности, определенное влияние на изменчивость возбудителей может оказывать явление симпатрии (сообитания) близкородственных видов иксодовых клещей в связи с их ролью переносчиков и хозяев возбудителей трансмиссивных природно-очаговых болезней.

Зоны симпатрии клещей палеарктической группы комплекса *I. ricinus* существуют благодаря тому, что экологические условия в них подходят для существования обоих видов. «Особенность симпатрии иксодид состоит в том, что она сопровождается не только сообитанием близких видов на обширной территории и нередко в одних и тех же биотопах, но и использованием одних и тех же видов прокормителей, а иногда – одних и тех же особей прокормителей» [67].

Для видов клещей комплекса *I. ricinus*, участвующих в циркуляции ВКЭ на территории Евразии, установлены зоны симпатрии двух пар видов: *I. persulcatus* - *I. ricinus* и *I. persulcatus* - *I. pavlovskyi*.

Зона симпатрии клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* наблюдается на границах их ареалов и включает в себя Прибалтику, Финляндию, Карелию, ряд областей Северо-Запада России [8] и совпадает с взаимным проникновением с востока формаций средней и южной тайги, а с запада – лиственных и смешанных лесов европейского типа (рис. 1.3). Типы ареалов этих видов, а также их биотопические связи дают основания предполагать, что формирование современной области симпатрии происходило путем расширения ареалов *I. ricinus* на восток, а *I. persulcatus* - на запад в послеледниковый период [63, 64].

Сезон паразитирования фаз развития этих клещей практически совпадает, за исключением того, что имагинальная фаза *I. ricinus* может иметь более длительный период весенней активности с последующим (менее высоким) пиком активности в конце лета.

Кроме того, важной особенностью сосуществования этих видов клещей в зоне симпатрии является также и практически полное совпадение спектра прокормителей. Так, имаго обоих видов паразитируют на средних и крупных диких млекопитающих, домашних и сельскохозяйственных животных, что создает возможность использования одной и той же особи прокормителя

обоими видами. Неполовозрелые стадии обоих видов обнаруживаются на одних и тех же видах, а иногда и особях позвоночных – грызунов, насекомоядных млекопитающих и птицах из экологических групп, собирающих корм на земле [57].

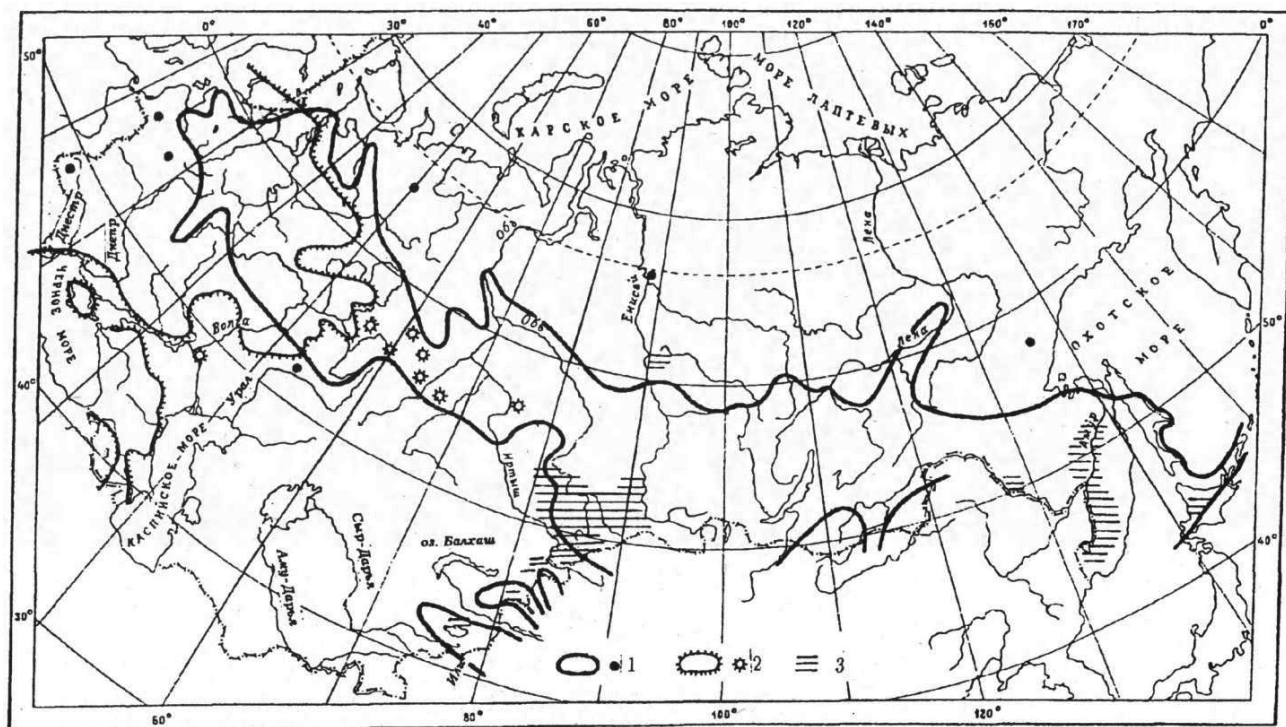


Рис. 1.3. Ареалы *I. persulcatus* (1), *I. ricinus* (2), *I. pavelovskyi* (3) и области симпатрии *I. ricinus* - *I. persulcatus* и *I. persulcatus* - *I. pavelovskyi* [67].

Две области симпатрии *I. persulcatus* - *I. pavelovskyi* на азиатском материке почти полностью соответствуют двум основным дизъюнктивным областям ареала *I. pavelovskyi*, соответствующим южным (Алтай) и юго-восточным (Сихотэ-Алинь с прилегающими малыми хребтами) окраинам ареала *I. persulcatus* (рис. 1.3).

В обеих дизъюнктивных областях симпатрии оба вида совместно обитают в одних и тех же биотопах при полном совпадении сезонов активности соответствующих фаз. Личинки и нимфы обоих видов паразитируют примерно в равных пропорциях в одни и те же сроки на одних

и тех же видах хозяев: мелких млекопитающих и птицах из экологической группы, собирающей корм на земле [61]. Более того, одновременное паразитирование преимагинальных фаз *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* на одной и той же особи хозяина при высоком обилии каждого вида – обычное явление для этой зоны симпатрии. На половозрелой фазе оба вида вылавливаются на флаг одновременно и также примерно в равном количестве. Несмотря на это, в Юго-Западном Алтае установлена четкая хозяйственная специализация клещей на половозрелой фазе развития: *I. persulcatus* паразитирует на средних и крупных диких млекопитающих, а также на скоте; *I. pavlovskyi* – почти исключительно на птицах из экологической группы, собирающей корм на земле (и частично на тех же видах, что и неполовозрелые фазы, но в более ранние календарные сроки); *I. persulcatus* на птицах не обнаружен [61, 62]. Глубокие корни дифференцированной трофической специализации половозрелой фазы *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* подтверждаются специфическими чертами строения хелицер самок [64].

*Механизмы репродуктивной изоляции, действующие в областях симпатрии близкородственных видов I. persulcatus - I. pavlovskyi и I. persulcatus - I. ricinus.*

Необходимым условием спаривания симпатрических партнеров служит морфологическое соответствие органов, участвующих в спаривании. При любом сочетании партнеров в области симпатрии *I. persulcatus* - *I. ricinus* непосредственных морфологических препятствий для скрещивания не было выявлено [69]. Однако, как было показано экспериментально, эти виды характеризуются полной репродуктивной изоляцией. Так, самки обоих видов откладывали гибридные яйца, но развившиеся из особи первого гибридного поколения были полностью стерильны [5]. Стерильность межвидовых гибридов не может быть объяснена существенными различиями в



кариотипах. Этим видам свойственны 28 хромосом одинаковых размеров и идентичный механизм определения пола типа XX и XY [5]. По мнению Балашова Ю.С., репродуктивная изоляция этих видов, по-видимому, обусловлена и генетической несовместимостью [5]. Это согласуется с точкой зрения Филипповой Н.А. о вторичном характере симпатрии, так как наличие посткопуляционного (генетического) механизма репродуктивной изоляции у симпатрических видов свидетельствует об аллопатрическом пути формирования их ареалов [65].

Как было отмечено выше, в обеих дизъюнктивных областях симпатрии *I. persulcatus* и *I. pavelowskyi* существует высокая степень специализации половозрелой фазы каждого вида к таксономической группе хозяев. В результате отсутствует возможность контакта противоположных полов разных видов в процессе питания на одном прокормителе. Кроме того, на основе морфометрических исследований репродуктивных органов этих видов было показано, что морфологические препятствия для копуляции существуют только при сочетании партнеров самка *I. pavelowskyi* - самец *I. persulcatus*. Однако, спаривание клещей этой пары все же возможно в период питания самки, так как происходит изменение размеров половых органов и нивелирование морфологических барьеров. Наличие непосредственно ограничивающего спаривание морфологического барьера, хотя и частичного, наряду с выявленными ранее физиологическим и паразито-хозяинным барьерами, свидетельствует о высокой степени надежности многоступенчатой негенетической преграды для гибридизации [68, 69]. «Вопрос о том, существует ли генетическая посткопуляционная репродуктивная изоляция у этой симпатрической пары видов, остается открытым. Однако можно предположить с высокой степенью уверенности, что она и не нужна: выявленные на данном этапе негенетические барьеры в состоянии обеспечить репродуктивную изоляцию, и непосредственно

ограничивающий спаривание морфологический барьер вносит здесь свою лепту» [69].

#### **1.4. Существующие представления об эволюции ВКЭ**

Вопросы эволюции ВКЭ всегда вызывали большой научный интерес, поскольку их решение позволяет понять закономерности возникновения возбудителей новых трансмиссивных природно-очаговых вирусных заболеваний. Понимание процессов эволюции ВКЭ дает возможность учета возможных факторов, сопутствующих появлению новых вирусов, а также прогнозирование последствий уже вновь появившихся вирусов комплекса клещевого энцефалита.

По прошествии нескольких десятилетий после установления этиологии КЭ на Дальнем Востоке (50-70-е годы прошлого столетия) сложилось четкое представление о распространении заболевания и ареале возбудителей КЭ. Однако, нозологическая самостоятельность КЭ на Западе и Востоке СССР на протяжении многих лет оставалась предметом дискуссии [9, 23, 72]. На основании экологических и эволюционных представлений В.М. Жданов предложил существование двух видов вирусов КЭ [21]. Сторонники этой гипотезы допускали, что эти вирусы имели общего предка. Их разделение произошло вследствие сначала географической изоляции, существования в различных экосистемах, и наконец, – генетической изоляции [9].

Существовала и другая точка зрения, основанная на близости антигенных свойств штаммов, согласно которой ВКЭ представлен одним видом вируса, имеющим два подтипа – Западный и Восточный [110]. Одним из основных аргументов в пользу этой гипотезы являлся факт того, что два вируса встречаются в Европейской части СССР на одной и той же территории, а в отдаленных частях ареалов – только один из них [111].

Важным достижением в понимании эволюции ВКЭ того времени было сформировавшееся представление о том, что иксодовые клещи являются

первоначальными и основными хозяевами вируса, а животные выступают в качестве дополнительных хозяев. Вирус может размножаться в клещах на различных фазах их развития и передаваться трансвариально и трансфазово даже в том случае, когда клещи питаются на нечувствительных к вирусу животных, в организмах которых он не репродуцируется и не появляется в крови в количестве достаточном для заражения клещей [9].

Известно, что основными хозяевами вируса Западного варианта КЭ являются клещи *I. ricinus*, а Восточного – клещи *I. persulcatus*. Именно длительное пребывание двух вирусов в различных видах иксодовых клещей привело к становлению антигенного своеобразия вирусов Западного и Восточного – существованию «рицинусного» и «персультатусного» типов [73].

Огромным прорывом в понимании эволюции ВКЭ послужило развитие молекулярно-генетических методов и внедрение их в область молекулярной эпидемиологии возбудителей трансмиссивных природно-очаговых инфекций в конце XX века. Первой попыткой дать развернутый сценарий эволюционных событий, связанных с происхождением и распространением ВКЭ, стала работа Zanotto P.M. с коллегами. На основе сравнения 24 нуклеотидных последовательностей гена Е и соответствующих им аминокислотных последовательностей вирусов ККЭ авторы предложили гипотезу клинального распространения ВКЭ по Евразийскому континенту в направлении с востока на запад в последние несколько тысяч лет (рис. 1.4А) [304]. Проведенный анализ выявил корреляцию между географической и генетической дистанциями вирусов ККЭ. Распространение ВКЭ началось предположительно с Дальнего Востока, по расчётам авторов, около 2500 лет назад. Авторы этой работы отводили ключевую роль в эволюции и распространении вирусов ККЭ иксодовым клещам как основным хозяевам, несмотря на значение позвоночных животных в трансмиссивном цикле вируса [304]. Штаммы ВКЭ-Сиб и ВКЭ-Дв имеют общего предшественника и

теснее связаны между собой, чем с ВКЭ-Ев [147]. Время дивергенции субтипов ВКЭ-Сиб и ВКЭ-Дв произошло примерно 1700-2100 лет назад [164] и, следовательно, дивергенция внутри ВКЭ-Сиб субтипа должна была произойти позднее.

Клинальное распространение ВКЭ по Евразийскому континенту с решающей ролью иксодовых клещей в видообразовании вируса оставалась безальтернативной эволюционной гипотезой на протяжении почти 15 лет. В этот период рядом исследователей предпринимались попытки уточнить эволюционный сценарий, основываясь на собственных расчетах скорости нуклеотидных замен в геноме вируса или его фрагмента и определения времени дивергенции вирусов ККЭ, в частности субтипов ВКЭ [163, 164, 275, 292].

По мере накопления нуклеотидных последовательностей ВКЭ в базе данных GenBank рядом исследователей были предприняты попытки переосмыслить гипотезу клинального распространения ВКЭ на основе методологии молекулярных часов и филогенетического анализа. В частности, новосибирские ученые выдвинули гипотезу, согласно которой существенное влияние на эволюцию клещевых флавивирусов в северном полушарии оказали климатические изменения, происходившие после последнего оледенения. Температурные изменения, по мнению авторов, приводили к существенным изменениям природных ландшафтов северной Евразии, что могло стать фактором, обуславливающим дивергенцию филогенетических групп ВКЭ. Расчет времени дивергенции основных субтипов ВКЭ показал, что европейский субтип ВКЭ возник около 2750 лет назад. Дивергенция сибирского и дальневосточного субтипов произошла примерно 2250 лет назад [56]. Сходные значения времени дивергенции ВКЭ-Сиб и ВКЭ-Дв – от 1700 до 2800 лет назад – были получены и другими исследователями [275]. Однако, представление о том, что ВКЭ-Ев эволюционно более древний по

сравнению с азиатскими субтипами, противоречило общепринятым представлениям, связывающих возникновение ВКЭ с азиатской частью России. Согласно данной гипотезе, распространение ВКЭ по таежной зоне Евразии проходило не с востока на запад, а с запада на восток (рис. 1.4Б). К сожалению, авторы были вынуждены исключить из проведенного ими анализа нуклеотидные последовательности ряда штаммов (ЕК-328, 178-79 и 886-84), поскольку их включение, по их мнению, приводит к нарушению монотонности молекулярных часов. «Это может быть следствием технических ошибок, допущенных при изучении этих нуклеотидных последовательностей и/или может быть обусловлено наличием резких геномных изменений в самих этих вариантах» [56].

Наконец, совсем недавно группой американских исследователей была выдвинута третья, компромиссная гипотеза происхождения и распространения ВКЭ. Проведенный авторами анализ линейной и нелинейной регрессии в сочетании с Байесовским методом (программа BEAST) показал существование корреляции между генетической и географической дистанциями для ВКЭ и клещевых флавивирусов. На основании этого они делают предположение, что ВКЭ происходит от общего предка, который появился примерно 3100 лет назад, предположительно в Западной Сибири, и распространялся в двух направлениях – и на запад, и на восток Северной Евразии (рис. 1.4В) [168].

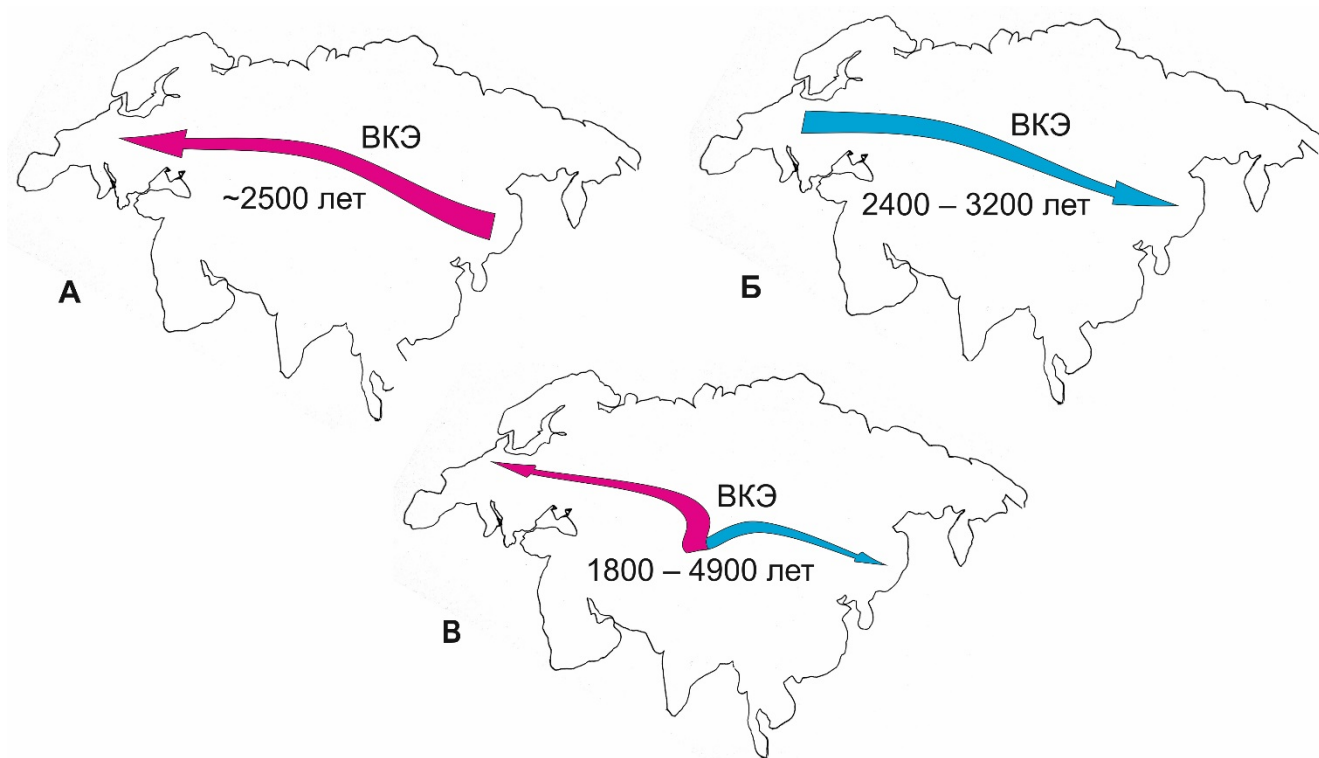


Рис. 1.4. Гипотезы происхождения и распространения ВКЭ на территории Северной Евразии

Таким образом, общая картина, основанная на данных молекулярной эпидемиологии и исследований нуклеотидной структуры ВКЭ, показывает, что генетическая вариабельность и возможности изменчивости ВКЭ весьма широки. Это позволяет ВКЭ быть весьма успешным в эволюционном плане и распространяться на огромных территориях Азии и Европы. Генетическая изменчивость и разнообразие ВКЭ до конца не изучены, что диктует необходимость дальнейших исследований. Именно исследование генетической изменчивости, особенностей генетической организации ВКЭ, а также других патогенных флавивирусов должны стать базой для дальнейшего развития и совершенствования методов профилактики и диагностики клещевого энцефалита [43].

## **1.5. Микроэволюционные процессы в популяциях РНК-содержащих вирусов**

### ***1.5.1. Основные понятия микроэволюции и её особенности у вирусов***

Под микроэволюцией понимаются эволюционные процессы, происходящие внутри популяции и вида и создающие многообразие генофонда, обеспечивая тем самым приспособление вирусов к изменяющимся внешним условиям. Вместе с тем микроэволюция может служить ступенью для видообразования.

Одним из основных терминов при описании популяций является понятие приспособленности. Приспособленность (fitness) – комплексный параметр, описывающий репликативную приспособляемость популяции к окружающей среде [125]. Мерой приспособленности конкретного фенотипа можно считать вклад соответствующего генотипа в следующее поколение относительно других генотипов в популяции, отражающий его вероятность выжить и дать потомство [239].

Эволюционные изменения вызываются взаимодействием трех основных процессов: изменчивости, воспроизведения и фиксации геномов в популяции.

Известно три механизма генетической изменчивости РНК-вирусов: реассортация фрагментов генома (у вирусов с сегментированным геномом), рекомбинации и мутации в виде одиночных нуклеотидных замен [175]. Так как флавивirusы, в том числе и ВКЭ, имеют несегментированный геном, то исследования вирусной изменчивости были сфокусированы на поиске рекомбинационных событий, а также причин и частоты возникновения мутаций в виде синонимических и несинонимических нуклеотидных замен.

Роль рекомбинации в эволюции флавивirusов в настоящее время является спорной. Основным аргументом в пользу её существования является тот факт, что в Новой Каледонии был выявлен пациент, одновременно

инфицированный генотипами I и II вируса лихорадки Денге (DENV), а также рекомбинантным вирусом этих двух генотипов [77]. Для идентификации рекомбинаций у флавивирусов, в частности у DENV-1, в основном используют методы биоинформатики – такие как, например, bootscanning [77, 79, 106, 278, 283]. Однако, несмотря на усилия многих научных групп, рекомбинация у флавивирусов не была показана экспериментально, поэтому к сообщениям о предполагаемых событиях рекомбинации следует относиться крайне осторожно [291]. Выявление естественных рекомбинационных событий между штаммами вируса важно для понимания эволюционных процессов. Для подтверждения наличия естественных рекомбинационных событий у вируса и участия рекомбинантного штамма в трансмиссии должны быть выполнены определенные условия. Во-первых, рекомбинантная область генома должна быть достаточно протяженной, чтобы она могла быть выявлена соответствующим филогенетическим анализом. Во-вторых, регион рекомбинации у родительских штаммов должен существенно различаться, чтобы позволить однозначно зафиксировать рекомбинационное событие. В-третьих, наличие рекомбинанта должно быть продемонстрировано на основе ПЦР-ампликона с последующим его клонированием. В-четвертых, рекомбинация должна быть неоднократно продемонстрирована в клональной популяции жизнеспособных вирусов (например, в бляшках вируса или по точке конечного разведения). И, в-пятых, рекомбинантный вирус должен сохраняться в процессе пост-рекомбинационной эволюции [278].

Ряд исследований, основанных исключительно на анализе генома вируса *in silico*, показал гипотетическую возможность рекомбинации у ВКЭ [16, 95, 132, 284]. Несмотря на отсутствие прямых доказательств существования рекомбинации у флавивирусов, некоторые исследователи, тем не менее, считают рекомбинацию основным фактором, объясняющим



высокую изменчивость ВКЭ. Так, например, наряду с тремя основными субтипами ВКЭ в районе озера Байкал (Иркутская область, Бурятия, Монголия) были выделены два существенно отличающиеся от них штамма - 178-79 и 886-84 [24]. Генетические отличия этих штаммов, как между собой, так и штаммами основных субтипов, составляют около 12% [14]. Существование у этих штаммов на всем протяжении генома участков, специфичных для каждого из трех основных субтипов, дало основание выдвинуть гипотезу о формировании "мозаичных" геномов в результате множественных рекомбинационных событий, происходящих при совместной репродукции в организме естественных хозяев вирусов, относящихся к разным субтипам [13, 14].

В отсутствие экспериментальных доказательств рекомбинации основным механизмом генетической изменчивости флавивирусов может считаться только мутационный процесс, вызванный одиночными нуклеотидными заменами. Для РНК-содержащих вирусов характерна высокая частота спонтанных мутаций – порядка  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  замен на сайт за репликативный раунд, для ДНК-содержащих организмов –  $10^{-8}$ - $10^{-11}$  [124]. Частота мутаций РНК-содержащих вирусов, выраженная в количестве мутаций на геном за один раунд репликации, определена в пределах от 0,1 до 1,0 мутаций, что на несколько порядков выше, чем у вирусов, чей геном представлен двухцепочечной молекулой ДНК [176]. Высокая скорость накопления мутаций рассматривается как предпосылка эволюционной пластичности РНК-геномных вирусов и их способности к быстрой изменчивости [171, 172, 254, 255]. Вместе с тем, высокая мутабельность снижает надежность системы, а слишком быстрое накопление мутаций может нарушить функцию генома. Однако, этого не происходит, поскольку стабильность РНК-содержащих вирусов в определенной мере обеспечивается

малым размером генома, значительной скоростью репликации и высоким выходом вируса.

Элиминация мутантных клонов и сохранение клонов дикого типа в вирусных популяциях происходит в результате деятельности направленного и стабилизирующего отбора. Направленный отбор приводит к адаптивному сдвигу популяции при изменении внешних условий, а стабилизирующий отбор поддерживает ее состав при постоянстве среды на определенных отрезках времени. Оба типа отбора благоприятствуют одним фенотипам и устраняют другие: при направленном отборе из популяции исчезают прежде господствующие фенотипы, которые больше не имеют селективной ценности в изменившихся внешних условиях, а действие стабилизирующего отбора направлено против мутантов, постоянно возникающих в хорошо адаптированной к среде популяции.

Параллельно отбору существует генетический дрейф – случайное изменение частоты встречаемости данного фенотипа (признака, генотипа, аллеля) в независимости от его приспособленности в результате случайной выборки в популяции ограниченного размера. Вследствие значительного уменьшения численности популяции – эффекта «бутылочного горлышка» (bottleneck) – генетический дрейф может оказаться более важной для эволюции вирусов движущей силой, чем естественный отбор [239].

### ***1.5.2. Теория квазивидов***

В связи с высокой частотой мутаций у РНК-содержащих вирусов, а также относительно большим размером их популяций, было высказано предположение, что к ним применима теория квазивидовой эволюции [122, 124, 127], изначально предложенная в 1977 Eigen и Shuster для описания ранних форм жизни («РНК-мира») [97, 130].

Квазивидовая модель предложена для случая равновесия мутационно-селекционного процесса и описывает гетерогенное распределение геномов вокруг одного или ограниченного числа наиболее приспособленных последовательностей, известных как «мастер»-последовательности [186]. «Мастер»-последовательность при репликации непрерывно генерирует спектр мутантов, но при этом поддерживает стабильную частоту в популяции, а не дивергирует и диффундирует над нейтральным пространством последовательностей.

Отличие квазивидовой модели от классической популяционной генетики заключается в том, что частота встречаемости какого-либо варианта зависит не только от его способности реплицироваться без ошибок, но также от вероятности его возникновения вследствие ошибок репликации с других матриц. Следовательно, благодаря мутационному сцеплению среди вариантов геномы не являются независимыми сущностями, и в действительности полное распределение мутантных форм организует кооперативную структуру, которая действует подобно (квази) одной единице (виду), откуда и возник этот термин. Квазивид эволюционирует скорее к максимальному уровню воспроизведения всего мутантного распределения, чем к увеличению частоты единственной наиболее приспособленной последовательности. Таким образом, мишенью естественного отбора является мутантное распределение как целое, в противоположность индивидуальным вариантам.

Хотя теория квазивида позволяет объяснить многие факты, строгих доказательств применимости этой теории для РНК-содержащих вирусов не было найдено [122, 126, 177, 186]. В вирусологической литературе термин «квазивид» чаще всего используют как синоним гетерогенности популяции, что не соответствует его определению.

Было выявлено наличие порога фенотипического проявления генотипов в квазивиде. Так, например, при смешении патогенных и непатогенных клонов вируса лимфатического хориоминенгита в определенных соотношениях развитие заболевания ингибировалось большим избытком непатогенных вирусных геномов, хотя при этом вызывающие заболевание варианты присутствовали в вирусной популяции на низком уровне [125]. Высоко приспособленный клон вируса везикулярного стоматита становился доминантным в исходной популяции этого вируса только тогда, когда был представлен выше критического уровня [116]. Живая аттенуированная полиовирусная вакцина может включать в свой спектр мутантов нейровирулентные варианты, но до тех пор, пока их содержание не достигло критического порога (1%), они не могут индуцировать поражения ЦНС у обезьян [108].

### ***1.5.3. Дефектные интерферирующие частицы и комплементация***

Одним из самых интригующих наблюдений, вытекающих из экспериментальной вирусологии, является то, что дефектные вирусные геномы, появившиеся в результате «вредных» мутаций, могут интерферировать с полностью функциональными вирусами, конкурируя с ними во время репликации. Они получили название дефектных интерферирующих частиц (ДИЧ), и впервые были обнаружены в клеточной культуре [181], а затем и в естественных условиях [173], особенно при высоких значениях множественного заражения (МЗ), когда одна клетка заражена более чем одним вирусом. Вероятно, существование ДИЧ является обычным явлением для многих РНК-вирусов.

Общепринятым объяснением феномена существования ДИЧ является комплементация, благодаря которой дефектные вирусы эффективно паразитируют на полностью функциональных вирусах при совместном

заражении клетки, используя их полный набор белков для завершения собственного жизненного цикла (этим объясняется их наибольшее распространение при высоких значениях МЗ). Комплементация чаще наблюдается у РНК-содержащих вирусов [83, 142, 145, 223, 237, 272, 281, 293]. Действительно, при высоком значении МЗ комплементация является ожидаемым и важным генетическим процессом. Существуют свидетельства того, что у некоторых вирусов выработались механизмы для предотвращения МЗ отдельных клеток, в том числе у ВИЧ [146] и у вируса гриппа А [182], тем не менее у этих вирусов часто происходит рекомбинации/реассортация, что указывает на то, что эти барьеры не абсолютны. Комплементация, в широком смысле, является также механизмом, посредством которого отдельные вирусные частицы многокомпонентных РНК-содержащих вирусов способны успешно размножаться [104].

До недавнего времени комплементацию наблюдали только *in vitro*, и было принято считать, что комплементация необходима ДИЧ только для того, чтобы выжить в течение нескольких поколений. Тем не менее, более поздние исследования дают основания предполагать, что явление комплементации широко распространено в природе [137] и может длиться очень продолжительные периоды времени [78]. Что еще более важно, комплементацию можно рассматривать как буфер против вредных мутаций, так как высокая частота комплементации снижает давление отбора на устойчивость к мутациям [235].

Именно комплементация может позволить вредным мутациям выживать в вирусной популяции в течение длительных периодов времени, включая множество циклов трансмиссии между хозяевами. Наиболее убедительным примером является филогенетическая линия вируса Денге (DENV-1), представители которой обнаруживались в течение 18 месяцев в

Мьянме (бывшая Бирма) и содержали стоп-кодон в гене белка Е, а также множество других, по-видимому, вредных несинонимических мутаций [78]. Дополнительными популяционно-генетическими и биохимическими исследованиями было подтверждено, что линия вируса с этим стоп-кодоном действительно была нежизнеспособна, и комплементация является единственным объяснением ее выживания в течение нескольких циклов передачи человек-комар.

Несомненно, явление комплементации позволяет вредным мутациям сохраняться в популяции вируса в течение длительного периода [138], тем самым создавая дополнительный материал для естественного отбора и, возможно, способствуя процессам видообразования. Однако, истинное эволюционное значение этого явления еще не до конца понято [141].

## **1.6. Концепции видообразования у вирусов**

### ***1.6.1. Филетический градуализм***

Существуют две концепции видообразования. Согласно первой из них, получившей название «филетический градуализм», новые виды образуются в результате естественного отбора внутри существующих. Образование вида представляет собой популяционное явление. Эволюционирует не особь, а популяция. Эволюция носит постепенный (градуальный) и непрерывный характер [11, 45]. Возникновение вида является результатом длительного процесса накопления незначительных изменений и поэтапной смены одних новых форм другими, приводящей к качественным сдвигам.

Данная концепция долгое время была основной концепцией видообразования, принятой в ортодоксальной синтетической теории эволюции. С небольшими поправками эта концепция применима и для вирусов. Согласно концепции филетического градуализма, первым этапом является изменение циркулирующих штаммов во времени, что впоследствии

может привести к формированию межпопуляционных различий. Независимая эволюция изолированных популяций может возвести их в ранг вида, и именно с такими видами можно встретиться при рассмотрении существующих в настоящее время вирусов.

### ***1.6.2. Квантовое видообразование***

Помимо филетического градуализма, имеется и другая концепция: видообразование происходит не путем постепенного накопления мелких изменений, а скачками, внезапно, в короткие промежутки времени. Появление нового вида означает перерыв постепенности в эволюционном развитии организмов, резкий фазовый переход. Внезапное, скачкообразное видообразование называют квантовым [2, 11]. Важное значение для развития концепции квантового видообразования имели исследования S. J. Gould и N. Eldredge (1977). Эти ученые создали гипотезу «прерывистого равновесия». Согласно их предположению, эволюционная история биосферы представляет собой совокупность длительных периодов относительной стабильности, которые перемежаются редкими периодами повышения эволюционной активности, приводящими к образованию новых видов и вымиранию старых. Переход от родительского к дочернему виду происходит в результате скачка и по сути своей отличается от медленной фиксации благоприятных мутаций, который обеспечивает градуалистический путь видообразования [150].

Соотношение между градуалистическим и квантовым видообразованием у вирусов определяется их популяционной структурой и эволюционными возможностями генома. Вирусная популяция представляет собой смесь отдельных клонов, не связанных между собой репродуктивно, поэтому популяционная структура вирусов не накладывает тех ограничений на распространение мутаций, которая имеется у высших эукариот. У вирусов любой мутантный клон, если он будет подхвачен отбором, может быстро

размножится и стать самым многочисленным в популяции. Таким образом, эволюция вирусов, даже если она основана только на мутациях, происходит скачками и носит взрывной характер. Размер скачков ограничивается эволюционными возможностями вирусного генома [70]. Из этого следует, что несмотря на скачкообразный, прерывистый характер видообразования, внутривидовая эволюция вирусов идет преимущественно по пути постепенного накопления изменений. Таким образом, этот процесс сочетает в себе элементы как квантовой, так и градуалистической эволюции. Он складывается из «микроскачков», которые приводят к поэтапной смене незначительно различающихся популяций. Именно по такому пути шло эволюционное развитие вирусов на протяжении документированного периода их истории [70].

Таким образом, РНК-содержащие вирусы могут демонстрировать как быструю эволюцию, так и относительный популяционный стазис [171]. Быстрой эволюции содействуют условия, которые ведут к потере популяционного равновесия, т.е. потере доминирования, прежде наиболее приспособленной «мастер» - последовательности и возрастанию доминирования новой (в рамках теории квазивидов). Это могут быть изменения внутренней среды – например, интерференция благодаря генерации дефектных интерферирующих частиц в персистентно инфицированной культуре клеток, а также внешней среды – инфекция новых хозяев или новых типов клеток.

### ***1.6.3. Смена хозяина («host jump») как ведущий фактор видообразования вирусов***

Прогноз появления новых вирусных инфекционных заболеваний является одной из наиболее важных целей в биомедицинской науке. Однако, в настоящее время эволюционная биология имеет слабое представление о



том, как возникают новые вирусы. Очевидно, что процесс их появления связан с таким явлением, как преодоление вирусом межвидового барьера и переходом его на новый вид хозяина («host jump») [248, 295, 296].

Для того, чтобы понять как патоген осуществляет «host jump», необходимо более подробно рассмотреть биологические процессы, происходящие при осуществлении этого эволюционного скачка.

Первым этапом является выявление новых видов-хозяев для конкретного возбудителя. Способен ли патоген совершить скачок с одного вида на другой, будет зависеть от экологии и поведения этих видов, а также от биологии передачи самого возбудителя. Предполагается, что межвидовой барьер может быть преодолен с наибольшей вероятностью в том случае, если «старый» и «новый» виды хозяев являются близкородственными [115, 273]. Поскольку «host jump», как правило, сопровождается сильным изменением генетических свойств, резко снижающим жизнеспособность вируса, механизм, который может облегчить данный процесс, состоит в наличии промежуточных хозяев, сочетающих в себе признаки как старого, так и нового хозяина. Например, предполагается, что промежуточным «смесителем» для вируса птичьего гриппа стали домашние свиньи, которые помогли вирусу приобрести мутации, позволяющие эффективно инфицировать человека [268]. Гималайская пальмовая куница (цивета) могла сыграть такую же роль в возникновении вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV [208].

На втором этапе необходимо оценить, способен ли патоген инфицировать нового хозяина, т.е. обладает ли он достаточным уровнем изменчивости и «совместим» ли он с новым хозяином. Хорошо известно, что РНК-вирусы преодолевают межвидовые границы значительно чаще, чем ДНК-вирусы, и это, вероятно, связано с разницей в скорости их эволюционных изменений [176, 296]. У РНК-вирусов эта скорость определена в пределах от 0,1 до 1,0 мутаций на одну репликацию генома, что на несколько порядков

выше, чем у вирусов, чей геном представлен двухцепочечной молекулой ДНК [176]. Интересно, что у вирусов с одноцепочечной ДНК отмечена почти такая же скорость эволюционных изменений, как у РНК-вирусов [176], и они могут довольно часто преодолевать межвидовые границы [270].

Решающее значение для способности вируса инфицировать хозяев является наличие подходящих рецепторов в клетках хозяина [294], причем чем консервативнее используемые рецепторы, тем шире круг потенциальных видов-хозяев. Например, использованием консервативных рецепторов можно объяснить широкий диапазон хозяев у вируса ящура, который использует интегриновый рецептор, и вируса бешенства, который использует никотиновый ацетилхолиновый рецептор [89].

Однако, даже если патоген способен инфицировать различные виды хозяев, он обычно, хотя и не всегда, для них менее заразен. Этот феномен носит название «видового барьера», и его значение может быть существенным в том смысле, что для нового вида-хозяина требуются более высокие дозы инфицирования патогеном. Например, для заражения собак или кошек титр вируса бешенства, выделенного от лис, должен быть в миллионы раз выше, чем для заражения других лисиц [98]. Эффективность передачи патогена от одного хозяина к другому может быть рассчитана на основе такого понятия, как репродуктивный потенциал -  $R_0$ . Патогены, перешедшие на новый вид хозяина путем преодоления межвидового барьера, в зависимости от значения репродуктивного потенциала могут быть разделены на две группы. Если в популяции нового хозяина  $R_0 < 1$ , то, несмотря на неоднократные случаи заражения, распространение возбудителя в такой популяции будет ограничено. И, наоборот, если в популяции нового хозяина  $R_0 > 1$ , то велика вероятность того, что циркуляция возбудителя в популяции будет происходить неопределенно долгое время [297].

Третьим и заключительным этапом, необходимым для совершения патогеном «host jump» на новый вид, является его способность успешно

передаваться между особями в пределах популяций нового вида-хозяина. Как было сказано выше, это относится к значению  $R_0$ , величина которого может указывать на то, как успешно патоген может распространяться в популяциях нового вида-хозяина.

Механизм, лежащий в основе адаптации к новому хозяину, может быть рассмотрен с точки зрения ландшафта приспособленности [131]. Так, одна ключевая (критическая) мутация может позволить вирусу преодолеть условный порог приспособленности, ниже которого мутации недостаточно выгодны для адаптации к новому хозяину (рис. 1.5). Таким образом происходит «прыжок» через глубокую «долину» приспособленности, соответствующую множеству промежуточных вариантов, неспособных эффективно размножаться ни в старом, ни в новом хозяине. Происходящий затем ряд менее значимых дополнительных мутаций оптимизирует эффективность репликации вируса в новом хозяине, «выталкивая» его на вершину нового адаптивного пика [174]. Данный механизм можно продемонстрировать на нескольких примерах. Так, сродство вируса к рецептору может быть лабильным [89], и достаточно всего лишь нескольких точечных мутаций в капсиде для того, чтобы вирус начал использовать новые рецепторы: например, вирус ящура может переключиться на использование дополнительных рецепторов после накопления им в культуре клеток всего несколько аминокислотных замен [90]; вирус панлейкопении кошек (FPLV) в результате некоторых изменений в аминокислотной последовательности капсида может развиваться до парвовируса собак, приобретая возможность использовать собачий трансферриновый рецептор [183]; адаптация VEEV к лошадям связана с изменениями в оболочечном гликопротеине [290].

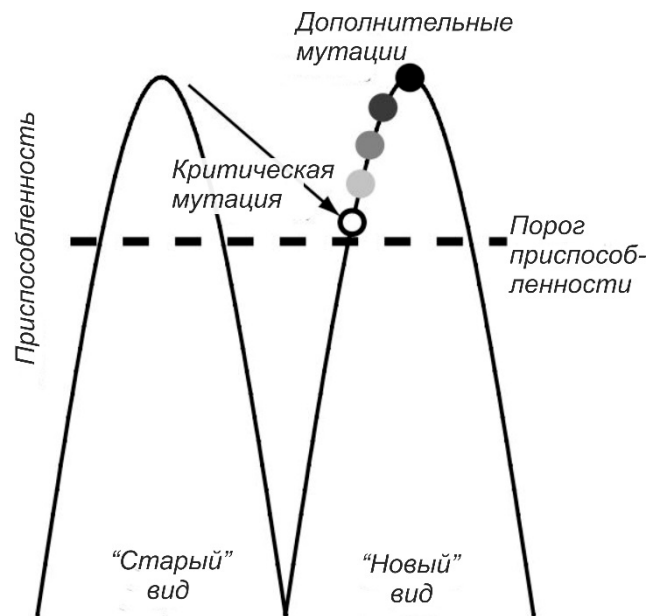


Рис. 1.5. Механизм смены хозяйинной специфичности у вирусов [174].

Результатом смены хозяина, несомненно, является накопление генетических различий между патогеном в исходном виде-хозяине и новом. Однако, определить время и место их возникновения часто затруднительно по ряду причин: (I) генетические события могли произойти в исходной популяции хозяина перед прыжком (т.е. существовала некая предрасположенность новых генотипов к «host jump»); (II) эти события могли произойти в ходе фазы «адаптации» в новом хозяине, в результате перехода от  $R_0 < 1$  к  $R_0 > 1$ ; или (III) в результате последовательной дивергенции возбудителя после того, как он попал в нового хозяина.

Явление преодоления вирусом межвидового барьера и перехода на новый вид хозяина, по-видимому, является важным фактором существования разнообразия возбудителей в ходе эволюции. Непредсказуемость появления новых патогенов означает необходимость осуществления эффективного надзора за идентификацией возбудителей и постоянного мониторинга популяций и территорий, где велика вероятность появления таких патогенов.

Рассмотренные концепции видообразования, основанные на теоретических представлениях о микроэволюционных процессах в популяциях РНК-вирусов, а также о внешних факторах, определяющих

направление эволюции вирусов (смена хозяина), лишь ограниченно применяются в изучении вируса клещевого энцефалита. По нашему мнению, данное положение дел может быть исправлено только путем применения комплексного подхода, основанного как на использовании последних достижений в области изучения механизмов появления (возникновения) новых вирусов, так и исследовании большого экспериментального материала по генетической изменчивости локальных вирусных популяций.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Материалы исследования**

В исследовании были взяты иксодовые клещи, полученные от людей, обратившихся по поводу укуса клеща в вирусологическую лабораторию ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» (ЦГиЭСО). Также были исследованы пулы клещей, собранные в природе энтомологами ФГУЗ ЦГиЭСО в районах Свердловской области (количество клещей в партии варьировало от 1 до 20 экземпляров). Кроме того, были исследованы одиночные клещи, собранные сотрудниками Лаборатории молекулярной генетики УрФУ в результате экспедиционной работы, а также волонтерами из различных регионов и областей России (Архангельская область, Пермский край, Свердловская, Курганская, Тюменская, Омская, Новосибирская и Томская области, Приморский край, Ханты-Мансийский Автономный округ, Ленинградская область, Алтайский край, Эстония). Все сборы проводились в эпидсезоны с 2005 по 2013 гг. В общей сложности было исследовано более 20 тыс. клещей.

В те же годы проводились исследования клинического материала: образцы сыворотки и плазмы крови больных клещевым энцефалитом, а также посмертные образцы тканей погибших от КЭ людей (в общей сложности более 200 образцов).

В данной работе были определены нуклеотидные последовательности 500 штаммов ВКЭ, которые представлены двумя группами. Первая группа представлена 54 штаммами ВКЭ, выделенными в период с 1966 по 1986 годы из клещей (или пулов) и клинических образцов, собранных на территории Свердловской области сотрудниками лаборатории арбовирусных инфекций Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (ЕНИИВИ). Штаммы этой группы были пассированы в мышах-сосунках, 10% мозговые суспензии которых были лиофильно высушены и заложены на хранение в

ампулированном виде без дальнейших пассажей в коллекцию вирусов ЕНИИВИ. Кроме того, в исследование были включены два штамма *SofjinVT1999* и *SofjinVM2001* из инаktivированных вакцин (см. раздел 3.4). Вторая группа представлена 446 изолятами вируса, выделенными с 2005 по 2013 годы из клещей (или их пулов) и клинического материала на эндемичных по КЭ территориях Северо-западной части России, Урала, Западной Сибири и Приморского края. Изоляты ВКЭ второй группы представлены геномной РНК, конвертированной в кДНК. В исследование также были взяты 604 нуклеотидные последовательности ВКЭ, размещённые в базе данных GenBank. Информация о номерах доступа в GenBank, географическом происхождении, времени и источнике выделения штаммов и изолятов ВКЭ приведена в Приложении I.

Во избежание терминологической путаницы «изолят» и «штамм» в дальнейшем будут именоваться как «штамм».

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Экстракция нуклеиновых кислот и обратная транскрипция**

Клещей замораживали в жидком азоте, измельчали и гомогенизировали в физиологическом растворе до получения гомогенной суспензии в пробирках типа Eppendorf объемом 1,5 мл. Для осаждения крупных фрагментов клещей пробирки центрифугировали 2 минуты при 10000 об/мин, при комнатной температуре или при 4 °C, в зависимости от типа используемой центрифуги. Вирусная РНК была экстрагирована из 100 мкл суспензии клещей, сыворотки крови больных или разведенной в ТЕ-буфере лиофилизированной мозговой суспензии инфицированных мышей-сосунков, и очищена с помощью наборов для выделения РНК - РНК-сорб или РНК-преп, если экстракция проводилась вручную, а также МАГНО-сорб (ООО «Интерлабсервис», Москва), если выделение проводилось автоматической

роботизированной станцией для экстракции нуклеиновых кислот и дозирования жидкостей XIRIL (Австрия), согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции с random-праймером проводили набором «РЕВЕРТА-R-100» (ООО «Интерлабсервис», Москва) согласно инструкции производителя.

### ***2.2.2. Амплификация ДНК***

Для проведения ПЦР использовали реагенты производства ООО «Интерлабсервис» (Москва), за исключением праймеров, синтез которых проведен ЗАО «Евроген» (Москва), НПК «Синтол» (Москва), ООО «ДНК-синтез» (Москва). В зависимости от поставленной задачи амплификацию проводили в объеме 25 мкл в амплификаторах «Терцик» производства НПФ «ДНК-технология» (Москва) и «Veriti™ Thermal Cycler» (Applied Biosystems, США). При проведении ПЦР применяли методику «горячего старта» путем разделения компонентов реакционной смеси парафином. Анализ продуктов амплификации осуществляли в 2% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Последовательности праймеров, а также условия проведения ПЦР, использованные в настоящей работе, приведены ниже.

### ***Диагностическая и типоспецифическая ПЦР***

На первом этапе исследования клещей была проведена диагностическая ПЦР с целью выявления положительных по ВКЭ образцов, затем штаммы ВКЭ были типированы с помощью двух однораундовых типоспецифических ПЦР: первая (ПЦР-смесь №1) – мультиплексная для выявления ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев, вторая (ПЦР-смесь №2) – ВКЭ-Сиб. Нуклеотидные последовательности и позиции, использованных праймеров, а также длины образующихся ПЦР-продуктов приведены в Таблице 2.1.



### Амплификация фрагмента гена *E*

Фрагмент гена *E* был амплифицирован гнездовой ПЦР как описано ранее [277], с незначительными модификациями [199]. ПЦР-продукт фрагмента гена *E* (506 н.п.) был использован для последующего определения его нуклеотидной последовательности.

### Амплификация фрагментов 28S рРНК и 12S рРНК клещей

Последовательности праймеров, используемых для амплификации, приведены в ранее опубликованных публикациях (12S рРНК - [92]; 28S рРНК - [227]. Состав реакционной смеси (общий объем 25 мкл) - 1х буфер, 3,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ дНТФ, 0,4 мкМ каждого праймера, 1 е.а. DiTaQ-полимеразы, 5,0 мкл пробы ДНК. Условия проведения ПЦР: 94 °С - 2 мин; 42 цикла: плавление 94 °С – 10 с, отжиг праймеров 59 °С – 10 с, синтез 72 °С – 15 с; 72 °С – 3 мин.

Таблица 2.1

Нуклеотидные последовательности праймеров для типоспецифической ПЦР

Наименование	Последовательность праймера (5'→3')	Т отжига праймеров, °C	Позиции (по AB062064)	Длина ПЦР – продукта, н.п.
диагностическая ПЦР				
TBEVsense	GTGCR <b>T</b> GCGTTTGCCTTCGGA	60	15-34	250
TBEVa-se250	CCCCATCATGCGCATCAACAC		264-244	
типоспецифическая ПЦР				
ПЦР-смесь №1 мультиплекс				
TBEVeur-s	CAAAGTCGAACCACACACGGGA	67	1397-1417	215
TBEVeur-as	AAGCCGTTGGAAGGTGTTCCA <b>C</b>		1611-1589	
TBEVfar-s	CATTGTGACCTGTGTCAAGGCGT		1310-1332	302
TBEVfar-as	AGGCCGTCGGTAGGTGTTCTG <b>A</b>		1611-1589	
ПЦР-смесь №2				
TBEVsib-s	GGCATCCTTCACGGTCTCCTCAGAA	67	1459-1483	152
TBEVsib-as	AGGCCGTCGGAAGGTGTTCCA <b>G</b>		1611-1589	

*Секвенирование генома ВКЭ (штамм SoffinKSY)*

Для секвенирования кодирующей области генома штамма *SoffinKSY* было получено тринадцать перекрывающихся ПЦР-продуктов. Нуклеотидные последовательности и позиции праймеров, использованных в настоящей работе, приведены в Таблице 2.2. Амплификация 5'-НТО и 3'-НТО была проведена с помощью набора "Mint RACE cDNA amplification set" (Евроген). ПЦР проводили в амплификаторе Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). Условия проведения ПЦР: 94 °С - 5 мин; 35 циклов: плавление 94 °С – 20 с, отжиг праймеров 60 °С – 30 с, синтез 72 °С – 1 мин; 72 °С – 5 мин. Фрагменты гена Е вакцинных штаммов были амплифицированы при тех же условиях.

Таблица 2.2

**Праймеры для секвенирования полного генома штамма *SofjinKSY* и гена E  
вакцинных штаммов**

Название праймера	Последовательность ( 5'→3' ) *	Позиция в геноме**	Длина ПЦР-продукта, н.п.
1F	TCCCGTGTTTGAAGTCTTTCTGG	168-189	1176
1R	GARACCGTGAAGGAYGCTGTT	1323-1343	
2F	TGGCTTGACTCCATYTTACCAGG	970-991	1122
2R	TCCGATCACTGTCTAGYCTTTCT	2070-2091	
3F	GACYTTCAGAACAYCTACCGACG	1452-1473	1251
3R	CAGATCATTGAGTGRCCCCA	2683-2702	
4F	TGGAGCTCCGYTGTGGTGAG	2360-2379	1134
4R	CACATGGCCGTTGTGCCAGT	3475-3494	
5F	AYAAAAGGGGGGCTTCTGTGAG	3206-3227	1086
5R	GGCTCACCTCTCCACCTTCATT	4270-4291	
6F	CGAGGACACAGAGAACAGAAGGG	3952-3974	1157
6R	ATGAGCTCCGGGAGGACTCTGT	5087-5108	
7F	AGGGAGTGGTTGTGGGGCTGTA	4904-4925	1142
7R	GCGGAAATGACCYGCCACCTCT	6024-6045	
8F	TGAYAGTGGACTTGTGCAGTGG	5916-5937	1150
8R	AGCCAYYACATGCCCTGCTA	7046-7065	
9F	GTCGTGGGAAGAGTGGACCAA	6852-6873	1203
9R	CGGTTYTTTCCACTGYTCCATGAG	8032-8054	
10F	CAAGTTCAGAGCGGGAATGGAT	7905-7926	1160
10R	TTCCYTCCACTCCAGATCCACT	9043-9064	
11F	AAGCTTGGAGAGTTYGGAGTGG	8917-8938	1195
11R	ACTCTGCCCTCTCTTTCCTCCC	10090-10111	
RACE праймеры:			
5UTRinner-R	GTTGCCGCRCTTTTTCTTC	394-413	
5UTRouter-R	ACCATTTGTGTCCCCTTCCT	654-673	
3UTRinner-F	GGACTACCTTTCCTGCATGGA	10176-10196	
3UTRouter-F	TTGTTGGGAGGAAAGAGAGGG	10085-10105	
3'_primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC ( T ) <sub>30</sub> VN		
PlugOligo adapter	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGGGG		
PCR Primer M1	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT		
Праймеры для амплификации гена E двух инактивированных вакцин			
GeneE F886	CCGTTGTGTGGYTGACYGTGGA	758-779	916
GeneE R1801	CCATCAATGTGCGCCACWGGA	1653-1673	
GeneE F1588	AACAYCTWCCGACGGCCTGG	1460-1479	955
GeneE R2542	TACCACTCKGAKACCTCCCTCC	2393-2414	
*	Дизайн праймеров был проведен на основе множественного выравнивания штаммов ВКЭ-Дв (GenBank Accession Nos. AY182009, JF316708, JF316707, GU121642, AY217093, FJ402885, DQ862460, EU816453, HM859895, FJ402886, FJ997899, EU816452, HQ901367, HQ901366, EU816455, FJ906622, EU816451, GQ228395, EU816450, HQ201303, AY169390, EU816454, DQ989336, AB062063, AB062064, HM859894)		
**	Согласно последовательности штамма <i>Senzhang</i> (GenBank Accession No. AY182009)		

Сборка полной геномной последовательности была проведена с помощью программы SeqScape software v. 2.5 (Applied Biosystems). Полногеномная последовательность штамма *SoffinKSY* и последовательности гена *E* двух вакцинных штаммов были размещены в GenBank под номерами JF819648, JF819650 и JF819651 соответственно.

*ПЦР-РВ для амплификации внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 и гена cox1 I. persulcatus и I. pavlovskyi*

Для определения видовой принадлежности клещей, собранных в Томской области (*I. persulcatus* или *I. pavlovskyi*), образцы ДНК клещей были исследованы методом ПЦР-РВ с использованием праймеров и видоспецифичных зондов (мишень – митохондриальный ген первой субъединицы цитохром С оксидазы (*cox1*) (Таблица 2.3).

Для выявления межвидовых гибридов клещей те же образцы ДНК были исследованы с помощью аналогичной ПЦР-РВ с праймерами и видоспецифичными зондами на ядерный внутренний транскрибируемый спейсер ITS2. Последовательности праймеров и зондов приведены в Таблице 2.3. Для определения соотношения аллелей разных видов у особей, показавших накопление флуоресцентного сигнала по двум каналам, нами было проведено смешивание образцов ДНК «чистых» видов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в разных пропорциях, а именно 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, с преобладанием одного или другого вида. Анализ кривых амплификации показал, что разница  $C_t$  позволяет определить количественное соотношение аллелей, но только в случае достаточного количества минорной матрицы – при соотношении ниже 1:8 определить  $C_t$  не представлялось возможным. Полученные для экспериментальных смесей значения  $\Delta C_t$  использовали для определения соотношения аллелей гибридов в природных популяциях.

ПЦР-РВ для амплификации *cox1* и ITS2 была проведена в объеме 25 мкл, реакционная смесь содержала 1 мкл каждого 5 мкМ праймеров и зондов, 1,5 е.а. TaqF ДНК полимеразы (ИнтерЛабСервис, Москва) и MgCl<sub>2</sub> в концентрации 3 мМ. Для амплификации было использовано 2,5 мкл экстракта ДНК. ПЦР-РВ была проведена в течение 40 циклов: денатурация 94 °С в течение 15 с, отжиг 50 °С в течение 20 с и элонгация при 60 °С в течение 40 с (*cox1*), отжиг и элонгация при 68 °С в течение 1 мин (ITS2). Для независимого подтверждения наличия гибридов клещей и интрогрессии мтДНК было проведено выборочное секвенирование переменных фрагментов генов ядерной 28S рРНК (согласно [227]) и митохондриального гена *cytb* (согласно [101]).

Таблица 2.3

Праймеры и зонды, используемые для дифференциации видов клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* методом ПЦР-РВ

Название праймера	Последовательность (5'→3')	Мишень	Определяемый вид	Длина ПЦР-продукта, н.п.
IxoF	ATATCAATAAGAATTTTAATYCG	<i>cox1</i> (мтДНК)	<i>I. persulcatus</i>	187
IxoR	CTATATCAGGTGCTCCTAATAT			
Iper_Probe	<b>R6G</b> -GGGGGATTGGTAACTGATTGATTCCTTT- <b>BHQ2</b>			
Ipav_Probe	<b>ROX</b> -GGAGGGTTCGGTAATTGATTAATTCCATT- <b>BHQ2</b>		<i>I. pavlovskyi</i>	
ITS2A-Ticks-F	TCTACCTCGTTTTGACTGTGTCTGG	ITS2 (ядДНК)	<i>I. persulcatus</i>	около 105
ITS2A-Ticks-R	CGTGCAATTTGCTCCCTYTGTACTT			
Probe-Persik2	<b>FAM</b> -ATGCTTTCTTGCGTTGCGTCTTCTCTTGTT- <b>BHQ1</b>			
Probe-Pavlik2	<b>ROX</b> -TAACTTTCTTGCGTTGCGTCTTCTYGTTTTTCAG- <b>BHQ2</b>		<i>I. pavlovskyi</i>	

#### ПЦР-РВ для амплификации ITS2 и гена *cox1* *I. ricinus* и *I. persulcatus*

Видовая принадлежность клещей, собранных на территории Эстонии (*I. ricinus* или *I. persulcatus*), была определена путем проведения двух реакций ПЦР-РВ с использованием видоспецифичных зондов, как описано выше.

Последовательности праймеров и зондов приведены в Таблице 2.4. Для увеличения чувствительности ПЦР-РВ для всех образцов была проведена

предварительная амплификация полной последовательности ITS2 в течение 20 циклов в объеме 5 мкл, при условиях как описано ранее [139].

ПЦР-РВ для амплификации ITS2 была проведена в объеме 25 мкл, реакционная смесь содержала по 1 мкл праймера ITS2\_B-TicksRP-R (5 мкМ) и зондов (5 мкМ), 4 мкл праймера ITS2\_B-TicksRP-F (5 мкМ), MgCl<sub>2</sub> (3 мкМ), дНТФ (100 мкМ каждый) и 1,5 е.а. TaqF ДНК полимеразы (ИнтерЛабСервис, Москва). Праймер ITS2\_B-TicksRP-F был взят с 4-х кратным избытком из-за присутствия в нем вырожденных нуклеотидов в трех позициях (Таблица 2.4). 5 мкл реакционной смеси после стадии предварительной амплификации было использовано для проведения ПРЦ-РВ, которая была проведена в течение 35 циклов при следующих условиях: денатурация 94 °С в течение 15 с, отжиг и элонгация при 68 °С в течение 1 мин.

Таблица 2.4

Праймеры и зонды, использованные для дифференциации видов клещей *I. ricinus* и *I. pavlovskyi* методом ПЦР-РВ

Название праймера	Последовательность (5'→3')	Мишень	Определяемый вид	Длина ПЦР-продукта, н.п.
IxoF_univ	ATATCWATAAGAATTTTAATYCG			
IxoR_univ	CTATATCWGGTGCWCCTAATAT			
Iper_Probe	<b>R6G</b> -GGGGGATTTGCTAACTGATTGATTCCTTT- <b>BHQ2</b>	cox1 (мтДНК)	<i>I.persulcatus</i>	187
Iric_Probe	<b>ROX</b> -GGTGGATTTGGAATTGATTAATTCCTTT- <b>BHQ2</b>		<i>I.ricinus</i>	
ITS2_B-TicksRP-F	<b>KACRGAGTTCGT</b> YGGCGCGT			
ITS2_B-TicksRP-R	TGCAAATCAACGCCACGAGA			
Probe-Persik4	<b>FAM</b> -CACAGCGGACGCCGCGTTTCAAACGC- <b>BHQ1</b>	ITS2 (ядДНК)	<i>I.persulcatus</i>	около 65
Probe-Ricin1	<b>ROX</b> -TTAATGGCGGACGCCGCGTTTCAAACGC- <b>BHQ2</b>		<i>I.ricinus</i>	

Для независимого подтверждения наличия гибридов клещей и интрогрессии мтДНК проводили выборочное секвенирование переменных фрагментов гена ядерной 28S рРНК и митохондриального гена *cytb*.

### Секвенирование

Определение нуклеотидных последовательностей ПЦР-продуктов проводили прямым секвенированием на генетическом анализаторе ABI PRIZM® 310 (Applied Biosystems, США) с использованием набора реагентов BigDye Terminator v.3.1, согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили в двух направлениях и использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР.

#### **2.2.3. Клонирование и скрининг ПЦР-продуктов**

Для образцов клещей, содержащих как аллели ITS2 *I. persulcatus*, так и *I. pavlovskyi*, была проведена амплификация полной последовательности ITS2 как описано ранее [139]. Полученные ПЦР-продукты длиной около 825 н.п. были очищены набором ДНК-сорб АМ (ИнтерЛабСервис) согласно рекомендациям производителя, после чего клонированы в вектор pAL-TA (Евроген) и трансформированы в компетентные клетки *E. coli* Top10. Для отбора трансформантов была проведена сине-белая селекция: клетки были посеяны на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, IPTG и X-Gal, и культивировались в течение ночи при 37 °С. Затем с каждой чашки стерильными зубочистками было отобрано 50 белых колоний, которые были помещены в 100 мкл физиологического раствора и прогреты при температуре 98 °С в течение 5 мин для выхода плазмидной ДНК в раствор. Фрагменты клеток были осаждены центрифугированием. Для определения видовой принадлежности каждого клона была проведена ПЦР-РВ с праймерами и зондами на ITS2 (Таблица 2.3), при этом использовался 1 мкл раствора плазмидной ДНК. Клоны ITS2 образцов с разными соотношениями аллелей *I. persulcatus*/*I. pavlovskyi*, а также клоны, характеризующиеся необычной кинетикой накопления флуоресцентного сигнала в ПЦР-РВ, были отобраны для последующего секвенирования.

Для образцов, содержащих аллели ITS2 *I. ricinus* и *I. persulcatus*, отбор трансформантов, определение видовой принадлежности каждого клона и секвенирование проводили как описано выше, с праймерами и зондами, указанными в Таблице 2.4.

#### **2.2.4. Филогенетический анализ**

Филогенетический анализ был проведен на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E длиной 454 н.п. (номера позиций с 311 по 762 н.п.) и аминокислотных последовательностей длиной 151 а.о. фрагмента белка E (с 104 по 254 а.о.) изученных нами штаммов, а также 604 последовательностей фрагмента гена E, размещенных в GenBank (Приложение II). Выравнивание, филогенетический анализ и построение деревьев проводили с помощью программы Mega v.5.0 [276]. Эволюционные дистанции были оценены методом Maximum Likelihood с использованием 2-параметрической модели Кимуры [193]. Дендрограммы были построены методом ближайшего соседа (Neighbor-Joining) [265] на основе p-distance матрицы.

Построение филогенетической сети проводили с помощью программы Phylogenetic Network Software v. 4.6.1.0 (fluxus-engineering.com), используя алгоритм MJ (Median-joining) [88].

#### **2.2.5. Расчет скорости нуклеотидных замен и оценка времени дивергенции штаммов ВКЭ**

Так как время выделения штаммов ВКЭ, включенных в исследование, известно, то, следовательно, возможно приблизительно оценить время дивергенции вирусных клонов. Скорость синонимических нуклеотидных замен была рассчитана с использованием метода Li W.H. с соавторами в 1988 году [209], в котором скорость рассчитывалась для пары последовательностей



(1 и 2) с третьей последовательностью (3), выбранной в качестве референсной (outgroup) по формуле:

$$k = (d_{23} - d_{13}) / t,$$

где  $k$  – скорость нуклеотидных замен,  $t$  – временной интервал между выделениями штаммов 1 и 2 (в годах) и  $d_{ij}$  – попарная генетическая дистанция по синонимическим нуклеотидным заменам между последовательностями “ $i$ ” и “ $j$ ”. Это уравнение было использовано для оценки скорости нуклеотидных замен в трех кластерах ВКЭ. Стандартное отклонение было рассчитано согласно общепринятым правилам. Время дивергенции штаммов может быть оценено методом, описанным ранее [209] при допущении, что нуклеотидные замены у штаммов накапливаются с постоянной скоростью.

#### *Определение понятия «кластерон».*

Штаммы были объединены в группы по принципу идентичности аминокислотной последовательности фрагмента белка Е и филогенетической близости нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е. Минимальное количество штаммов в кластероне для ВКЭ-Сиб соответствует трем. Для ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев, ввиду меньшего количества известных штаммов, минимальное количество штаммов в кластероне было уменьшено до двух. Штаммы с уникальной аминокислотной последовательностью, встретившиеся один или два раза, отнесены к группе «уникальные». Название кластеронов состоит из двух символов, первый из которых является номером субтипа (1-ВКЭ-Дв, 2-ВКЭ-Ев, 3-ВКЭ-Сиб), а второй – буквой, соответствующей уникальной аминокислотной последовательности кластерона. Обозначения штаммов одного кластерона,

принадлежащих разным филогенетическим линиям, были дополнены верхним индексом ( $3A^2$ ,  $3C^2$ ,  $3F^2$ ,  $3C^3$ ).

### *Географическое картирование кластеронов ВКЭ-Сиб*

Информация о территориальном распределении кластеронов ВКЭ-Сиб доступно в виде файла карты Google Earth Clusters\_TBEV-Cu6\_update1.kml (<http://dnk-ural.ru/nauchnaya-rabota/kleshchevoj-entsefalit>).

## **2.2.6. Структурное моделирование молекул РНК и белков**

### *Моделирование вторичной структуры 28S рРНК*

Вторичная структура была смоделирована для последовательности D3 сегмента 28S рРНК *I. persulcatus*, полученной в настоящей работе, а также последовательностей из GenBank (*I. persulcatus* AF303997, *Cordyceps scarabaeicola* AF339524, *Mus musculus* NR\_003279). Предсказание вторичной структуры осуществлялось при помощи программы Mfold (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=mfold>) методом нахождения наименьшей свободной энергии [305]. Полученные структуры были визуализированы с помощью программы RnaViz [118].

### *Структурный анализ гликопротеина E.*

Структура гликопротеина E ВКЭ-Ев (штамм Neudorfl), определенная методом рентгеноструктурного анализа (Protein Data Base [PDB] entry 1SVB) [258], была использована в качестве основы для компьютерного моделирования структуры белка E штамма Zausaev ВКЭ-Сиб (AA043537). Гомологичное моделирование было выполнено с использованием сервера ESyPred3D Web Server 1.0 (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>) [205]. Графическое представление трехмерной структуры гликопротеина E было выполнено с помощью программы RasMol версии 2.7.5 (<http://rasmol.org>) [267].

### **ГЛАВА 3. ОТДЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВКЭ И ЭВОЛЮЦИИ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS* НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ**

Для разработки проблемы происхождения, распространения и эволюции ВКЭ необходимо было прежде всего решить ряд вопросов, ответы на которые могли бы определить направление дальнейших исследований и интерпретацию полученных результатов. Во-первых, необходимо было установить особенности распространения субтипов ВКЭ на территории Среднего Урала, что позволило бы объяснить противоречивые данные, получаемые разными научными группами в разные годы. Во-вторых, найти подходы для дифференциации штаммов ВКЭ в пределах субтипа. В-третьих, выяснить причины того, каким образом штаммы ВКЭ-Дв попадали или попадают на неэндемичные для них территории Западной Сибири, Урала и Северо-западной части России. В-четвертых, понять, в силу каких причин референсный штамм *Soffin* существует в виде трех генетически отличающихся между собой штаммов ВКЭ. В-пятых, исследовать генетическую структуру клещей *I. persulcatus* в качестве возможного фактора, определяющего генетическую изменчивость вируса.

#### **3.1. Разработка типоспецифической ОТ-ПЦР и молекулярно - эпидемиологическая характеристика популяций ВКЭ на территории Среднего Урала**

Свердловская область является одной из неблагополучных по КЭ территорий. Например, максимальное с начала 2000-х годов число пострадавших от укуса иксодовых клещей (за весенне-летний период 2005 года) на данной территории составило около 35 тыс. человек, диагноз КЭ подтвержден у 454 человек, а в 11 случаях зарегистрирован летальный исход [180].

Для успешного решения задач по совершенствованию методов профилактики и диагностики КЭ большое значение имеет учет и использование новых научных данных, касающихся генетической variability возбудителя и географического распространения различных его генетических вариантов. Показано, что генотипирование вируса имеет не только эпидемиологическое, но, как предполагается, и клиническое значение [53]. Ранее проведенными исследованиями с помощью МГНК было установлено, что ВКЭ-Сиб доминирует на большинстве эндемичных территорий России, в том числе и в Уральском регионе [37]. Однако, генотипический состав вирусных популяций, циркулирующих в природных очагах отдельных территорий, таких как Свердловская область, требовал дальнейшего изучения и уточнения.

Известно несколько молекулярно-генетических подходов для определения субтипа ВКЭ - это гибридизация молекулярными зондами [28], анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов [35], определение нуклеотидных последовательностей генома или его фрагментов секвенированием. На наш взгляд, наиболее перспективным с точки зрения простоты использования в практике диагностических лабораторий является мультиплексная ОТ-ПЦР с типоспецифическими праймерами. Данный подход нашел широкое применение, например, для определения генотипов вируса гепатита С в клиническом материале [12, 246].

В настоящей работе нами была предложена простая однораундовая мультиплексная ОТ-ПЦР для генотипирования ВКЭ с типоспецифическими праймерами (табл. 2.1.), дизайн которых проводился с учетом субтип-специфичных аминокислотных замен в позиции 206 белка гена Е [6, 27]. Так, у штаммов ВКЭ-Дв в позиции 206 находится серин, у ВКЭ-Ев – валин, а у ВКЭ-Сиб – лейцин. В целях повышения чувствительности и специфичности системы генотипирования ВКЭ проводили одновременно в двух ПЦР

реакциях: в первой были использованы праймеры для выявления ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев, во второй – ВКЭ-Сиб. При оптимальных условиях данная система хорошо зарекомендовала себя при определении субтипа у прототипных штаммов ВКЭ (Рис. 3.1).

Все образцы кДНК (всего 167), определенные диагностической ОТ-ПЦР как позитивные, были исследованы разработанной системой генотипирования. Определение субтипа удалось провести лишь для 84 ОТ-ПЦР позитивных образцов (50,3%), вероятно, по причине меньшей чувствительности генотипоспецифической по сравнению с диагностической ПЦР. Установлено, что доминирующим на территории Свердловской области является сибирский субтип ВКЭ (более 95%) (табл. 3.1). Ни в одном случае не был обнаружен дальневосточный субтип ВКЭ, и только в четырех случаях (4,8%) выявлен европейский субтип. У одного из клещей было выявлено два субтипа ВКЭ одновременно (европейский, сибирский).

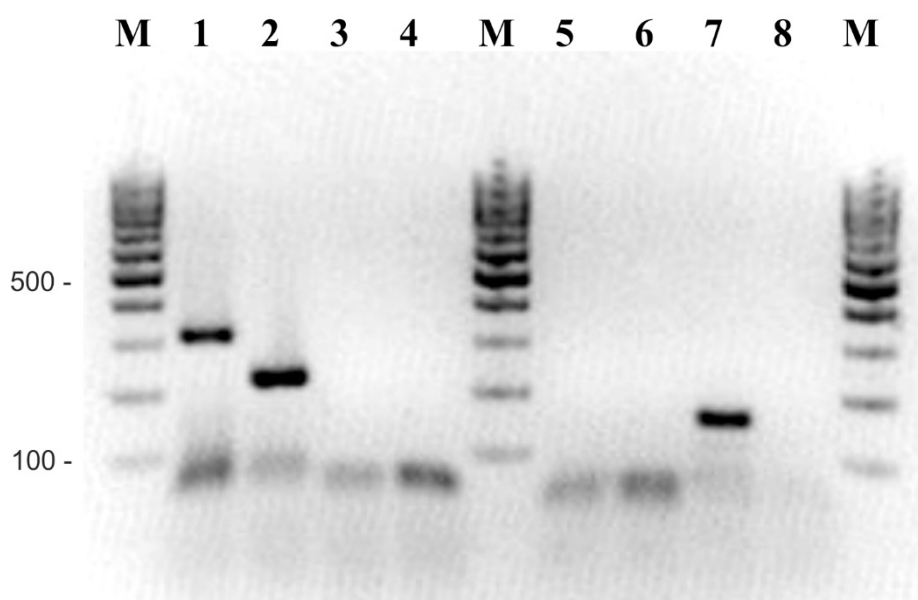


Рис. 3.1. Определение субтипов ВКЭ типоспецифической ОТ-ПЦР.

М – маркер молекулярных масс – «100 н.п. ДНК-маркеры» (СибЭнзим, Новосибирск). 1, 5 – штамм Sofjin (ВКЭ-Дв), 2, 6 – штамм Absettarov (ВКЭ-Ев), 3-7 – штамм 54 (ВКЭ-Сиб), 4, 5 – негативный контроль; 1-4 – ПЦР-смесь №1, 5-8 – ПЦР-смесь №2.

Представляется весьма любопытным, что дальневосточный субтип не был обнаружен на Среднем Урале в настоящей работе, хотя косвенные данные (наличие данного субтипа в соседних областях) указывают на то, что он также должен присутствовать и в Свердловской области. Наши результаты подтверждаются данными, полученными при изучении клещей, собранных в Свердловской области в 2004 году: все 19 штаммов, выделенных на территории области, принадлежали сибирскому субтипу [34]. С другой стороны, по неопубликованным данным Погодиной В.В., у нескольких экземпляров клещей, собранных в 2003 году в районе г. Н-Тагила (190 км севернее Екатеринбурга) был обнаружен ВКЭ дальневосточного субтипа. Не вызывает сомнений, что доминирование сибирского субтипа на территории Свердловской области является практически полным, и данный факт необходимо принимать во внимание при изучении географии распространения субтипов ВКЭ на территории России.

Таблица 3.1

Результаты типирования ВКЭ-позитивных клещевых суспензий

	ОТ-ПЦР позитив.	Типи- ровано	Субтипы ВКЭ			
			ВКЭ-Дв	ВКЭ-Ев	ВКЭ-Сиб	ВКЭ-Ев+ ВКЭ-Сиб
2005						
От людей	62 (100%)	39 (62,9%)	0	2 (5,1%)	37 (94,9%)	0
2006						
От людей	68	33 (48,5%)	0	1 (3,0%)	31 (94,0%)	1 (3,0%)
Природа	32	11 (34,3%)	0	0	11 (100%)	0
Клинич. материал	5	1 (20%)	0	0	1 (100%)	0
Итого	105 (100%)	45 (42,8%)	0	1 (2,2%)	43 (95,6%)	1 (2,2%)
2005-2006						
Всего	167 (100%)	84 (50,3%)	0	3 (3,6%)	80 (95,2%)	1 (1,2%)

Проведенное исследование вносит ясность в вопросе о структуре популяции ВКЭ в Свердловской области, важным признаком которой является полное доминирование в природных очагах сибирского субтипа ВКЭ, а единичные находки ВКЭ европейского и, возможно, дальневосточного субтипов не имеют сколько-нибудь существенного значения. Учет полученных в настоящей работе данных необходим для разработки региональной стратегии профилактики КЭ.

Позднее были проведены исследования генетического разнообразия ВКЭ на территории Среднего Урала методом секвенирования фрагмента гена Е, которые полностью подтвердили полученные в настоящей работе результаты, за исключением факта редких находок штаммов ВКЭ-Ев. Анализ этих последовательностей выявил интересную особенность. Незначительная часть штаммов (менее 5%) вирусной популяции ВКЭ-Сиб имела в позиции 206 (лейцин) вместо часто встречающегося триплета СТС треплет ТТС. Наличие такого триплета, во всей видимости, приводило к частичному отжигу праймера, специфичного для ВКЭ-Ев, в результате четыре штамма ВКЭ-Сиб в данном исследовании были ошибочно отнесены к ВКЭ-Ев.

По результатам проведенной работы можно утверждать, что на территории Среднего Урала, представленного Свердловской областью, распространен исключительно ВКЭ-Сиб. Другой важный вывод - секвенирование генома ВКЭ является наиболее информативным из всех существующих методов генотипирования ВКЭ. Высокая изменчивость вирусного генома приводит к тому, что только определение нуклеотидной последовательности может исключить ошибки, возникающие при использовании других методов типирования.

### **3.2. Происхождение и распространение вируса клещевого энцефалита ВКЭ-Сиб на Среднем Урале, в европейской части России и в Прибалтийских странах**

Для изучения особенностей происхождения и понимания механизмов распространения и поддержания природных очагов ВКЭ-Сиб на территории Среднего Урала возникла необходимость дифференциации штаммов ВКЭ в пределах субтипа. При этом перед нами встала дилемма – либо применить традиционный подход, связанный с выделением штаммов вируса и последующим изучением их генетических характеристик, либо использовать генетический материал вируса, извлеченный непосредственно из клещей. В связи с тем, что выделение и пассирование штаммов ВКЭ требует особых условий и значительных финансовых издержек, а кроме того, может приводить к изменению генома вируса (Lee et al., 1997; Romanova et al., 2007), было решено проводить изучение генетического разнообразия ВКЭ без предварительного пассирования. Данный подход позволяет исследовать большое количество РНК-изолятов вируса, выделенных непосредственно из клещей, животных или клинического материала, с наименьшими затратами. Поскольку в данном случае количество генетического материала, доступного для исследования, ограничено, встает вопрос о необходимости выбора информативного фрагмента вирусного генома, достаточного для дифференциации вирусной популяции. В настоящей работе мы остановили свой выбор на гене поверхностного гликопротеина Е. Во-первых, он является основным структурным мембранным белком ВКЭ, который опосредует связывание вириона с клеточными рецепторами, определяет тропизм, вирулентность и обеспечивает образование вируснейтрализующих антител [261]. Во-вторых, ранее было показано, что нуклеотидная последовательность



гена этого белка является хорошей мишенью для определения филогенетических отношений как между вирусами комплекса КЭ, так и между субтипами в пределах одного вида вируса [140, 220, 224, 225, 304]. Этот участок генома относительно консервативен, но при этом уровень его вариабельности достаточен для калибровки молекулярных часов [129, 159, 166, 167]. По ряду причин для анализа нами был выбран фрагмент гена Е длиной 454 н.п. (номера позиций с 311 по 762 н.п. без участков отжига праймеров), кодирующий фрагмент гликопротеина Е со 104 по 254 а.о. Во-первых, он содержит как консервативные, так и вариабельные участки [140, 218]; в него входят важные аминокислотные замены в позициях 175, 206 и 234, на основе которых выделяют субтипы и филогенетические линии ВКЭ-Сиб [32, 129, 147]. Во-вторых, на момент проведения исследований в GenBank уже имелось достаточное количество последовательностей, включавших данный фрагмент, что позволяет провести сравнительный анализ наших данных с данными, полученными другими исследователями. В-третьих, размер данного участка представляет собой компромисс между достаточной информативностью и возможностью его амплификации непосредственно из зараженного клеща (минуя стадию выделения штамма), что позволяет исследовать максимальное количество образцов вируса, полученных за сезон из природных очагов КЭ, практически в режиме реального времени. В-четвертых, сравнительный филогенетический анализ свидетельствует о высокой информативности выбранного фрагмента. Так, сравнение дендрограмм, полученных на основе 130 последовательностей кодирующей части генома и фрагмента гена Е, показало практически полное их совпадение, за исключением двух штаммов (8696 KF880804, Buzuuchuk KJ626343) (рис. 3.2)

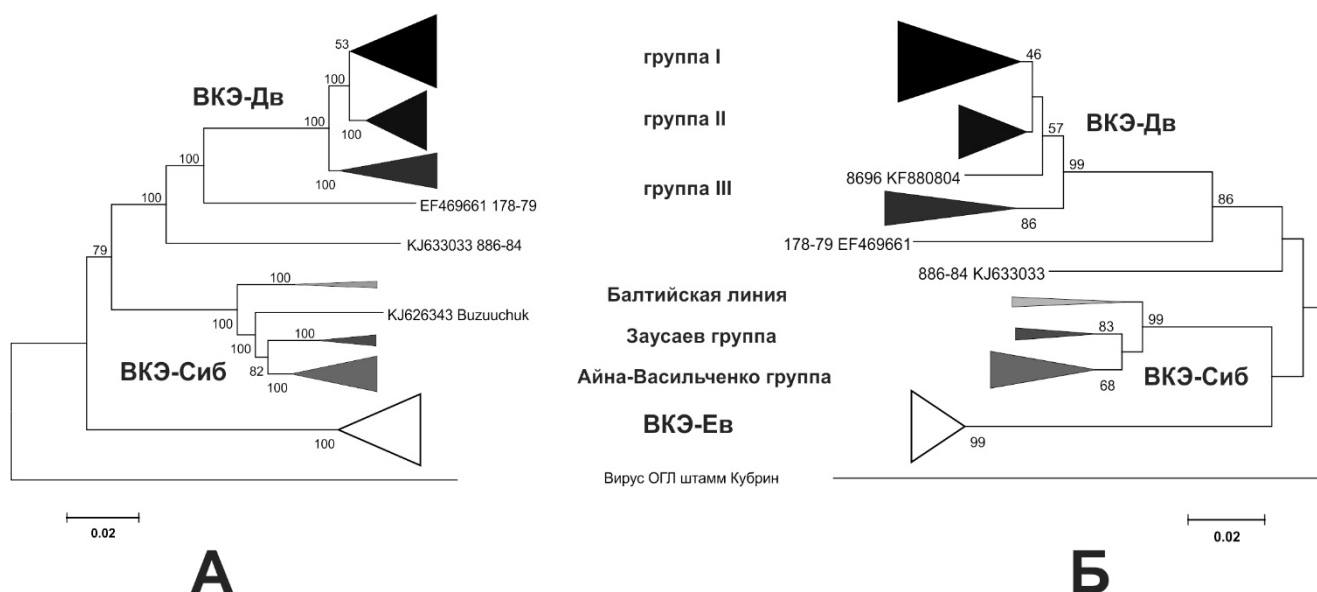


Рис. 3.2. Дендрограммы, построенные на основе нуклеотидных последовательностей 130 штаммов ВКЭ методом объединения ближайших соседей (neighbor-joining). А. – ген полипротеина (10217 н.п.); Б. – фрагмент гена Е (454 н.п.). В качестве внешней группы был взят штамм вируса ОГЛ. Полный вид дендрограмм представлен в Приложении I

Нами были определены нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные последовательности фрагмента гена Е (454 н.п., 151 а.о. соответственно) у 165 РНК-изолятов и штаммов ВКЭ сибирского субтипа (Приложение II). Идентичность изученных штаммов ВКЭ-СиБ по этому участку генома на территории Среднего Урала и соседней с ней Тюменской области по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям составила 94,0% и 97,4% соответственно.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е изученных штаммов, а также штаммов ВКЭ-СиБ из GenBank не позволил выделить филогенетически обособленные группы штаммов за исключение Балтийской филогенетической линии (Приложение III). Однако, анализ соответствующих аминокислотных последовательностей фрагмента белка Е дал возможность сделать ряд важных выводов (Рис. 3.3).

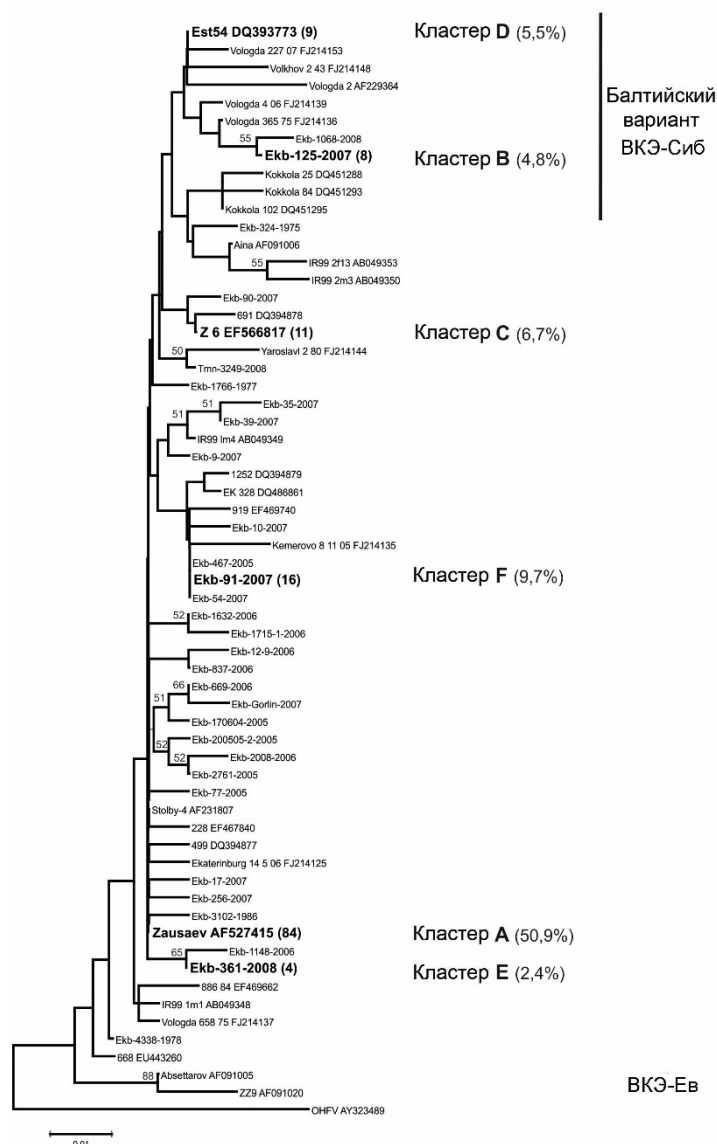


Рис. 3.3. Дендрограмма, построенная на основе аминокислотных последовательностей фрагмента гликопротеина Е 165 штаммов ВКЭ-Сиб. Группы штаммов, обладающих одинаковыми последовательностями, представлены прототипными штаммами, названия которых выделены жирным шрифтом. Число штаммов в кластере указано в скобках. В качестве внешней группы использована последовательность вируса ОГЛ.

Восемьдесят процентов изученных штаммов ВКЭ-Сиб (132 штамма) представлено шестью кластерами, которым были даны названия А, В, С, D, Е и F (Рис. 3.4, Приложение II). Под кластером в данном случае понимается совокупность штаммов ВКЭ с идентичной аминокислотной последовательностью фрагмента белка Е. Важным является тот факт, что штаммы, выделенные на территории Среднего Урала, представляют

практически всё генетическое разнообразие штаммов ВКЭ-Сиб, встречающихся как на Европейской части России и в Прибалтийских странах, так и в Сибири.



Рис. 3.4. Соотношение кластеров ВКЭ-Сиб по числу входящих в них штаммов (всего 165 штаммов, выделенных на территории Свердловской области).

Нами была составлена карта Среднего Урала с указанием мест изоляции штаммов, входящих в кластеры (Рис. 3.5). При анализе полученных данных были выявлены четыре типа распределения штаммов. Первый тип – *локальный*, при котором штаммы встречаются исключительно на ограниченной территории. Такой тип распределения соответствует кластерам В и Е, которые были обнаружены только на территории Байкаловского и Сысертского районов соответственно. Второй тип – *расщепленный*, характеризующийся распределением штаммов на значительном расстоянии друг от друга без очевидной связи между собой. Такой тип наблюдается для кластера С, штаммы которого встречаются в Байкаловском и Верхотурском районах, а также на территории г. Екатеринбурга. Третий тип получил название *коридорный*, поскольку определяется расположением штаммов вдоль протяженных транспортных



(от  $10^{-4}$  до  $10^{-5}$  нуклеотидных замен на сайт в год) [95, 274, 275, 284, 292], что существенным образом может отразиться на точности определения времени дивергенции штаммов вируса.

Для расчета скорости генетической изменчивости ВКЭ нами был использован методологический подход, описанный в работе Li W.H. с соавторами в 1988 году для установления времени появления вируса иммунодефицита человека в Северной Америке [209].

Оценка скорости нуклеотидных замен проводилась на основе сравнения последовательностей современных штаммов (2005-2008 гг.) и штаммов, выделенных на территории Свердловской области в период с 1966 по 1986 гг. сотрудниками Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (ЕНИИВИ). Таким образом, скорость нуклеотидных замен была определена напрямую путем измерения количества мутаций, появившихся у современных штаммов по сравнению с предковыми за известный промежуток времени на конкретной территории.

Для минимизации ошибки расчета скорости накопления мутаций штаммы ВКЭ должны были соответствовать следующим критериям: во-первых, места выделения штаммов должны быть расположены на близком расстоянии друг от друга; во-вторых, штаммы не должны иметь несинонимических нуклеотидных замен на исследуемом фрагменте гена E, т.е. должны принадлежать одному кластеру штаммов; и в-третьих, они должны быть филогенетически тесно связаны между собой, т.е. представлять собой клональную группу штаммов.

Вышеперечисленным требованиям соответствовали штаммы из трех кластеров – А, В и D. Средние значения скорости генетической изменчивости для этих кластеров составили  $1,35 \pm 0,39 \times 10^{-4}$ ,  $1,43 \pm 0,43 \times 10^{-4}$  и  $1,89 \pm 0,82 \times 10^{-4}$

нуклеотидных замен на сайт в год соответственно. Поскольку скорости, рассчитанные независимо для каждого кластера, отличались друг от друга не более чем на 30%, для дальнейших расчетов было взято их среднее значение. Таким образом, средняя скорость для ВКЭ-Сиб составила  $1,56 \pm 0,29 \times 10^{-4}$  нуклеотидных замен на сайт в год и оказалась близка значению скорости нуклеотидных замен, определенной для ВКЭ-Дв –  $1,62 \times 10^{-4}$ , рассчитанной ранее для полноразмерного гена E [275]. Возраст популяции ВКЭ-Сиб, определенный на основе рассчитанной средней скорости нуклеотидных замен, составил 383 (324-472) года. Другими словами, штаммы ВКЭ-Сиб должны были появиться на территории Среднего Урала не ранее XVII века.

Было установлено, что 20 (12%) исследованных штаммов, входящих в кластеры В и D, а также родственные им уникальные штаммы (Рис. 3.3, Приложение II), генетически близки штаммам, выделенным на территории Европейской части России (Ярославская, Вологодская и Ленинградская области), а также в Прибалтийских странах (Эстония, Латвия и Финляндия). Кроме того, в Свердловской и Курганской областях группой исследователей в 2008 году было выделено пять подобных штаммов: Ekaterinburg-27-11-06 (FJ214123), Kurgan-264-07 (FJ214130), Kurgan-269-07 (FJ214129), Kurgan-272-07 (FJ214128), Kurgan-273-07 (FJ214131) (Приложение II) [189]. Все эти штаммы принадлежат так называемой «Балтийской» филогенетической линии ВКЭ-Сиб [147], характерной особенностью которой является наличие аспарагина (Asn) вместо треонина (Thr) в позиции 175 белка E (Рис. 3.6). Представители этой группы штаммов не встречаются в Сибири восточнее Тюменской области. Возраст этой группы штаммов составил 274 (232-338) года.

		119	134	158	167	171	173	175	188	196	201	204	217	228	232	234	255
Zausaev	AF527415	A	A	S	V	K	I	T	V	Q	E	K	R	K	A	H	Y
Kokkola-102	DQ451295	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-118	DQ451296	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-25	DQ451288	V	.	.	.	.	.	N	.	R	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-26	DQ451289	V	.	.	.	.	.	N	.	R	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-39	DQ451290	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-79	DQ451291	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-8	DQ451286	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-81	DQ451292	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-84	DQ451293	V	.	.	.	.	V	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-86	DQ451294	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kokkola-9	DQ451287	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ekaterinburg-27-11-06	FJ214123	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Est54	DQ393773	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ek-328	DQ486861	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	R	.	.	.	.
Est3535	DQ393774	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	R	.	.	.	.
Ekb-90-2007	GU444224	.	.	.	.	.	.	N	.	.	R	.	.	.	.	.	.
Kurgan-264-07	FJ214130	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kurgan-269-07	FJ214129	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kurgan-272-07	FJ214128	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Kurgan-273-07	FJ214131	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ekb-1656-1969	GU444153	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ekb-1956-2007	GU444220	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Latvia 1-96	AJ415565	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ekb-2172-2005	GU444168	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tmn-3258-2008	GU444286	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ekb-5-1-2006	GU444194	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ekb-5444-2005	GU444183	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ekb788-2006	GU444206	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Ekb-9-2-2006	GU444195	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tmn-9-2007	GU444244	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Volkhov-2-43	FJ214148	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	H	.	.	.	.	.
Vologda-227-07	FJ214153	.	V	.	.	.	.	N	.	D	.	.	.	.	.	.	.
Vologda-3-75	FJ214143	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Vologda-509-75	FJ214142	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Vologda-911-74	FJ214138	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Yaroslavl-115-01	FJ214145	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Yaroslavl-140-98	FJ214146	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Vologda-2	AF229364	.	.	.	.	R	.	N	G	.	.	.	.	.	.	.	F
Ekb-1068-2008	GU444267	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-1070-2008	GU444268	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-125-2007	GU444253	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-14-1975	GU444139	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-22-1975	GU444141	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-26-1975	GU444142	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-33-1975	GU444143	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-42-1975	GU444148	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-7-1975	GU444137	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Ekb-9-1975	GU444138	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	G	Q	.
Vologda-365-75	FJ214136	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	Q	.
Vologda-15-06	FJ214140	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	Y	.
Vologda-4-06	FJ214139	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	Y	.
Yaroslavl-2-80	FJ214144	.	.	T	I	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Рис. 3.6. Вариабельные аминокислотные остатки в рассматриваемом фрагменте гликопротеина Е (104-255 а.о.) штаммов ВКЭ-Сиб Балтийской филогенетической линии. Показана специфичная для группы аминокислотная замена в 175 позиции (N). Для сравнения взят штамм *Zausaev*.

Неожиданным оказался тот факт, что 50,9% штаммов (84), выделенных на Среднем Урале, имело идентичные аминокислотные последовательности фрагмента белка Е (кластер А) (Рис. 3.4, Приложение II). В этот кластер



входили штаммы из Западной Сибири (Курганская, Тюменская, Кемеровская и Новосибирская области), а также Восточной Сибири (Иркутская область) (Приложение II). Типичным представителем данной группы штаммов является штамм Zausaev, выделенный в Новосибирске от больного хроническим клещевым энцефалитом [156]. В кластер А входят штаммы, которые встречаются в азиатской части России, но до настоящего времени не были найдены в Европейской части России и Прибалтийских странах.

Возраст этой группы штаммов, по нашим данным, составляет 396 (335-488) лет, однако представители этого кластера на Среднем Урале ограничены возрастом в 218 (184-268) лет. Таким образом, штаммы, входящие в кластер А, могли попасть на территорию Среднего Урала не ранее конца XVIII века. Пространственно-временной анализ результатов позволил нам сделать предположение о том, что заселение штаммами ВКЭ-Сиб территории Среднего Урала проходило дважды. Первое заселение началось в конце XVI - в начале XVII веков, а второе - в конце XVIII века. При этом источниками распространения были разные природные очаги ВКЭ-Сиб Западной Сибири.

Вопрос о происхождении и распространении штаммов ВКЭ на территории Евразии является одним из главных для понимания эволюции этой группы вирусов. Общепринятая точка зрения, как отмечалось выше, сводится к тому, что штаммы ВКЭ распространились с востока на запад Евразийского континента в последние 1700-2100 лет [164], однако механизмы и движущие силы быстрого распространения вируса клещевого энцефалита на столь огромных территориях до сих пор неясны. Особенность арбовирусов состоит в том, что их распространение непосредственно зависит от переносчиков и резервуарных хозяев. Хотя млекопитающие и птицы могут переносить клещей на значительные расстояния [164, 178, 288], в естественной среде обитания они, за редким исключением, не мигрируют в широтных направлениях, и следовательно, не подходят на роль решающего фактора в масштабном распространении ВКЭ.

Сопоставление возраста отдельных групп штаммов с историческими событиями, происходившими на территориях, где эти штаммы были выделены, позволило нам предложить принципиально иной подход к рассматриваемой проблеме. Наша оценка возраста вирусной популяции ВКЭ–Сиб, циркулирующей на территории Среднего Урала, составила чуть менее 400 лет, что хорошо согласуется со временем такого исторического события, как начало освоения Сибири Московским государством. Именно в 1598 году было окончено строительство и начала действовать первая сухопутная Дорога в Сибирь, которая связала Европейскую часть России с Западной Сибирью и пролегла по маршруту Москва – Ярославль – Сольвычегодск – Чердынь – Соликамск – Верхотурье – Тюмень – Тобольск – Сургут – Нарым (Рис. 3.7). Она просуществовала более 150 лет, являясь единственной дорогой в Сибирь через Уральские горы, и официально прекратила свое существование во второй половине XVIII века. Таким образом, мы связываем появление первых штаммов ВКЭ на территории Среднего Урала с началом действия первой сухопутной Дороги в Сибирь. Особенностью этой дороги было то, что она пролегла по Северным территориям Европейской части России и стыковалась с путями, ведущими в Прибалтийские страны.

Распространение группы штаммов Балтийской филогенетической линии ВКЭ-Сиб, возраст которого был определен нами почти в 300 лет, а также других штаммов, не входящих в данную группу, могло проходить именно по этой дороге. Местом происхождения этих штаммов, вероятно, были природные очаги Северо-западных территорий Западной Сибири на участке Тюмень – Тобольск – Сургут – Нарым.

К середине восемнадцатого века первая сухопутная Дорога в Сибирь полностью утратила свое экономическое и политическое значение, поскольку с 1763 года весь транспортный поток в Сибирь начал идти через Транссибирскую магистраль, которая пролегла южнее первой по маршруту Москва - Киров – Пермь – Екатеринбург – Тюмень – Омск – Красноярск –

Иркутск, и которая действует по настоящее время. Следствием функционирования этой дороги стала вторая волна распространения штаммов ВКЭ-Сиб на Средний Урал, происходившая из природных очагов юго-восточных территорий Западной Сибири. Свидетельством этому являются штаммы кластера А, которые широко распространены в Западной Сибири, но не встречаются в Европейской части России. Возраст штаммов кластера А, оцененный нами в чуть более 200 лет, подтверждает данное предположение.



Рис. 3.7. Расположение двух дорог из Европейской части России в Сибирь.

Веским аргументом в пользу того, что штаммы ВКЭ-Сиб распространялись по транспортным путям, является обнаружение кластеров D и F с коридорным типом распределения (Рис. 3.5). Интересно, что штаммы кластера D, принадлежащие Балтийской филогенетической линии ВКЭ-Сиб,

также встречаются и на участке Екатеринбург – Тюмень, что, по-видимому, является следствием вторичного распространения штаммов «Балтийского» варианта ВКЭ-Сиб на территории Среднего Урала.

Если сопоставить распределение штаммов с расположением и функционированием транспортных путей, то расщепленный и диффузный типы распределения штаммов на территории Среднего Урала являются ничем иным, как вариантами коридорного типа. Особенно контрастно это видно из распределения штаммов кластера А, распространение которых происходило радиально из столицы Среднего Урала – Екатеринбурга. Первоначально штаммы, входящие в этот кластер, попали по Транссибирской магистрали из Сибири через Тюмень в Екатеринбург, а затем по дорогам местного значения распространились по территории всего Среднего Урала в северном направлении до городов Серов и Краснотурьинск, в южном – до Челябинска, в северо-восточном – до Алапаевска, в западном – до Шали, в юго-западном – до г. Нижние Серги (Рис. 3.5).

Как же дороги могли повлиять на распространение штаммов ВКЭ? Известно, что первая сухопутная дорога в Сибирь, а также Транссибирская магистраль (до появления железной дороги), по которым осуществлялось торговое, почтовое и другое сообщение, представляли собой дороги в виде узких просек в тайге, достаточных для проезда гужевого транспорта. Клещи *I. persulcatus* могли переноситься на большие расстояния лошадьми, домашним скотом, а также собаками, которые сопровождали обозы, идущие из Сибири. Кроме того, перенос клещей мог происходить за счет миграций вдоль этих дорог синантропных видов млекопитающих и птиц. Продолжительность питания взрослой самки клеща *I. persulcatus* на млекопитающем составляет в среднем  $8 \pm 2$  дня [198], и нетрудно подсчитать, что, преодолевая в день вместе

с обозом в среднем 50 км пути, самка клеща могла быть перемещена на расстояние в 300 – 500 км от того места, где она начала питание.

Роль крупного рогатого скота в распространении вирусов ККЭ была продемонстрирована ранее. Так, McGuire с соавторами показали, что вирус ШЭО посредством перемещения крупного рогатого скота сначала попал из Ирландии в Великобританию через Уэльс, а затем распространился по территории Шотландии, Северной Англии и Норвегии [225].

Подводя итог вышесказанному, можно сделать вывод о том, что распространение ВКЭ-Сиб на Среднем Урале, а в последующем и на Европейской части России, происходило в два этапа. Первый этап связан с функционированием первой Дороги в Сибирь, и занос штаммов ВКЭ-Сиб происходил из северо-западной части Западной Сибири. Второй этап связан с действием Транссибирской магистрали, следствием чего стало распространение на территории Среднего Урала штаммов из юго-восточной части Западной Сибири. Местоположение Среднего Урала является уникальным, поскольку обе дороги из Сибири проходили по его территории, расходясь за г. Тюмень, в северо-западном и западном направлении. Таким образом, основным фактором в распространении штаммов ВКЭ-Сиб на территории Евразии, вероятно, является хозяйственная деятельность человека, которая привела к выносу штаммов вируса из природных очагов, существовавших в Западной Сибири. Выражаясь метафорически, людские потери от клещевого энцефалита - это та дань, которую заплатили европейцы за колонизацию Сибири.

Определенная нами скорость нуклеотидных замен  $1,56 \times 10^{-4}$  для фрагмента гена Е оказалась весьма близка по значению скорости  $1,62 \times 10^{-4}$  нуклеотидных замен на сайт в год, рассчитанной ранее для штаммов ВКЭ-Дв

на основе полноразмерного гена E [275], однако она существенно отличается от скорости  $2,9 \times 10^{-4}$ , полученной другой группой исследователей для того же участка генома ВКЭ-Дв [164]. Учитывая большую выборку штаммов ВКЭ-Сиб, мы полагаем, что наши молекулярные часы, определяющие время дивергенции штаммов, работают точнее с единицей времени в среднем 13,67 лет на одну нуклеотидную замену в данном участке генома и более объективно отражают скорость эволюции ВКЭ-Сиб. Хотя для проведения молекулярно-филогенетических исследований оптимально брать последовательности целых геномов ВКЭ или полноразмерных генов, в нашем исследовании сравнительный анализ относительно небольшого фрагмента гена E оказался достаточным для получения удовлетворительных результатов.

Филогеографический анализ, проведенный в нашем исследовании, убедительно показывает, что штаммы ВКЭ сначала появились на Среднем Урале, затем в Европейской части России и только потом в Прибалтийских странах.

Настоящим исследованием мы продемонстрировали теснейшую связь между молекулярно-генетическими данными и историческими событиями, которая раскрывает новые горизонты для молекулярной эпидемиологии опасных вирусных заболеваний.

### **3.3. Происхождение штаммов незндемичных субтипов ВКЭ на территории бывшего СССР**

#### ***3.3.1. Происхождение штаммов незндемичных субтипов ВКЭ в ходе реализации Программы по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц***

Ретроспективным исследованием коллекции штаммов ВКЭ Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций, выделенных в период с 1966 по 1986 годы, было установлено, что на территории Среднего Урала циркулируют штаммы двух субтипов ВКЭ – сибирского и дальневосточного. Доля штаммов ВКЭ-Дв составила 18,6% (11 из 59). Однако, доля штаммов этого субтипа, выделенных на той же территории в период с 2005 по 2009 годы, составила всего лишь 1,3% (2 из 151). Таким образом, мы отмечаем более чем десятикратное снижение количества штаммов ВКЭ-Дв, которое произошло примерно за 40-летний период. Такая же тенденция многократного снижения доли ВКЭ-Дв была обнаружена группой исследователей, проводивших независимое исследование другой выборки штаммов ВКЭ, выделенных на территории Среднего Урала в период с 1939 по 2006 годы [54].

Если в период с 1966 по 1986 годы штаммы ВКЭ-Дв были обнаружены в пяти различных районах Свердловской области, то выделенные в 2007 году два штамма ВКЭ-Дв – только в одном (Приложение IV). По своей сути они являлись клонами, так как имели идентичную нуклеотидную последовательность фрагмента гена Е и были изолированы из клещей *I. persulcatus*, собранных на одном участке. Наши попытки обнаружить в этом районе ВКЭ-Дв на протяжении последующих лет оказались безуспешными. Аналогичная ситуация сложилась и в отношении тех территорий Среднего Урала, на которых ранее (60-80-е годы прошлого века) выделяли штаммы ВКЭ-Дв. На основании представленных результатов можно предположить, что на территориях, где эндемичным является ВКЭ-Сиб, очаги КЭ,

образованные штаммами вируса дальневосточного субтипа, были нестабильны, с относительно коротким временем существования. Принимая во внимание тот факт, что штаммы ВКЭ-Дв фиксировались на территории Среднего Урала еще с конца 30-х годов прошлого столетия [54], а также учитывая высокую скорость элиминации этих штаммов из вирусной популяции (как было показано выше), можно предположить, что, попав однажды в то время на территорию Среднего Урала, они должны были исчезнуть значительно раньше. Следовательно, должен был иметь место некий фактор, обеспечивающий последующий приток штаммов ВКЭ-Дв с Дальнего Востока на территорию области, прекративший свое существование в 90-х годах двадцатого века.

Проведенный нами молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е штаммов ВКЭ-Дв, выделенных на территории Свердловской области, а также штаммов этого генотипа, выделенных на территории Европейской части России и бывших республик СССР (Латвия, Эстония, и Украина), а также Сибири, показывает, что эти штаммы генетически близки различным штаммам ВКЭ-Дв, выделенным на Дальнем Востоке России и в восточной части Северного Китая, за исключением группы штаммов Oshima из Японии (Рис. 3.8, Приложение IV).

Из рисунка 3.8 и приложения III видно, что расположение мест выделения штаммов ВКЭ-Дв на территории Среднего Урала и Европейской части бывшего СССР носит мозаичный характер без очевидной связи между собой, что говорит в пользу их случайного появления. Время выделения большинства из них (почти 90%) приходится на годы существования Советского Союза (до распада СССР в 1991 году) (Приложение IV).

Другой важной особенностью штаммов ВКЭ-Дв, выделенных на территории Европы, является то обстоятельство, что география их распространения ограничена на западе Европейской частью бывшего Советского Союза и не включает сопредельные государства. Мозаичный характер распространения штаммов ВКЭ-Дв на неэндемичных территориях



не укладывается в гипотезу клинальной эволюции ВКЭ и его последовательной экспансии на новые географические районы. Параллельная эволюция ВКЭ в ограниченном географическом районе представляется еще менее вероятной. Это позволяет предположить, что очаги ВКЭ-Дв возникли в новых географических районах относительно недавно. Они могли быть связаны с экономической деятельностью человека в этих районах или с заносом инфицированных клещей перелетными птицами. Действительно, рядом авторов показано, что птицы могут переносить клещей, тем самым распространяя ВКЭ на значительные расстояния [164, 178, 288]. Однако, сезонная миграция птиц в основном осуществляется в меридианных, а не широтных направлениях. Маловероятно появление перелетных птиц с Дальнего Востока или Восточной Сибири на Урале и тем более в Украине или Эстонии.

Ранее нами была показана решающая роль хозяйственной деятельности человека в распространении штаммов ВКЭ-Сиб на Среднем Урале, Европейской части России и в странах Прибалтики, связанная с процессом колонизации европейцами Западной Сибири в недавнем историческом прошлом (раздел 3.2). Вполне логично предположить, что антропогенный фактор явился определяющим в появлении штаммов ВКЭ-Дв в Восточной Европе, на Урале и в Сибири.

В связи с этим мы попытались определить наиболее вероятный вид человеческой деятельности, в результате которого происходило бы перемещение штаммов ВКЭ-Дв на огромные расстояния, и который отвечал бы следующим условиям. Во-первых, он должен был проходить в границах бывшего СССР, во-вторых, носить случайный, но в тоже время постоянный характер и приходиться на годы существования Советского Союза, в-третьих, быть масштабным и охватывать всю территорию бывшего СССР, и, наконец, в-четвертых, иметь отношение к клещам и (или) их прокормителям.

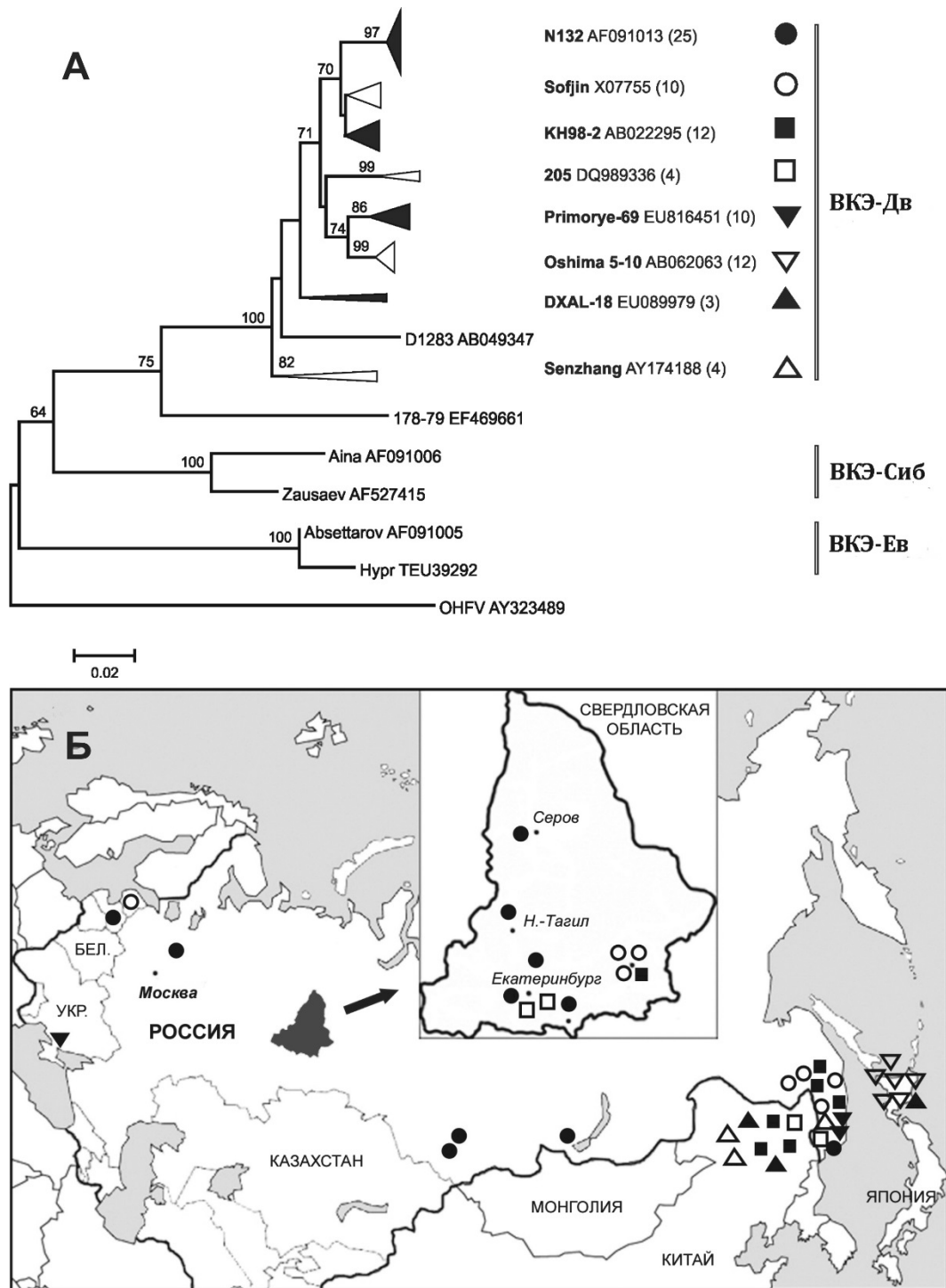


Рис. 3.8. Распространение штаммов ВКЭ-Дв на территории бывшего СССР. **А.** Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е штаммов ВКЭ-Дв. Группы штаммов, названные соответственно прототипным штаммам, выделены значками. **Б.** География выделения штаммов ВКЭ-Дв на территории бывшего СССР, выноска – территория Свердловской области. Значки соответствуют выделенным группам.

После рассмотрения истории экономической деятельности в бывшем СССР, а также пространственно-временного анализа мест выделения штаммов ВКЭ-Дв мы пришли к выводу, что наиболее вероятным видом хозяйственной деятельности человека, удовлетворяющим вышеперечисленным условиям, была долгосрочная государственная Программа по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц («Программа») [51]. В основе реализации данной программы лежала «...целенаправленная перестройка качественного и количественного состава охотничье-промысловой фауны страны с тем, чтобы полнее и эффективнее использовать кормовые ресурсы Земли для превращения их через объекты охоты в пушнину и мясо» [48].

«Программа» действовала на протяжении более 60 лет с начала 30-х до середины 90-х годов. Впечатляют масштабы «Программы». Так, до 1974 года было расселено 45 видов диких животных (зайцеобразные, плотоядные и копытные) и 8 видов птиц (рябчики, тетерева, куропатки, фазаны, водоплавающие). Только пушных зверей было расселено общим количеством более 430 тыс. особей и более 140 тыс. животных, имеющих значение, главным образом, для любительской охоты. Трудно точно назвать общее количество переселенных животных за все время действия «Программы», но по грубым оценкам оно составляет более миллиона особей млекопитающих и более 400 тыс. особей птиц [48, 49, 50, 51].

Переселяемые виды зверей и птиц в своем большинстве являлись естественными прокормителями иксодовых клещей, поэтому они могли либо переносить зараженных вирусом клещей, либо сами, будучи инфицированными, заражать клещей в местах выпуска штаммами ВКЭ из мест их отлова. Следует отметить, что реализация «Программы» проходила на территории бывшего СССР и практически не затрагивала другие государства.

В «Программу» были вовлечены все области России и Союзные республики бывшего СССР. Преимущественно расселение зверей и птиц носило направленный характер – с Востока на Запад, из малонаселенных территорий Восточной Сибири и Дальнего Востока в Западную Сибирь, Урал и особенно в Европейскую часть бывшего Советского Союза, включая Эстонию, Латвию, Литву, Белоруссию, Украину. Однако, этот процесс, хотя и в меньших масштабах, проходил и в обратном направлении. Возможно, переселением некоторых видов животных из Европейской части СССР вызвано появление штаммов ВКЭ-Ев (FJ214154, FJ214155, AF231806) в Восточной Сибири (Иркутская область). Так, например, в 1938-39 годах на территорию Иркутской области было завезено 225 особей зайца-русака (*Lepus europaeus* Pallas) из лесостепной зоны Башкирии [50].

Средний Урал, представленный главным образом Свердловской областью, был активно вовлечен в «Программу». В частности, 61 особь пятнистого оленя (*Cervus nippon* Temm.) [50], 123 особи кабана (*Sus scrofa* L.), а также 43 особи косули (*Capreolus capreolus* L.) [49] в разное время действия программы было завезено с Дальнего Востока (Приморский и Хабаровский край), и этот список может быть продолжен. Аналогичная ситуация была и в Европейских областях России, а также в республиках бывшего СССР (Эстония, Латвия, Литва, Белоруссия, Украина), куда было интродуцировано большое количество особей различных видов зверей и птиц из Восточной Сибири и Дальнего Востока [48, 49, 50, 51].

При ретроспективных исследованиях КЭ весьма трудно обнаружить эпидемиологическую связь между местом выпуска животных и местом выделения штаммов ВКЭ-Дв по целому ряду причин. Так, например, точное место выпуска животных не обязательно соответствует их фактическому местонахождению, поскольку они могут мигрировать на многие десятки

километров от места выпуска. С другой стороны, значительное количество штаммов ВКЭ-Дв, чьи нуклеотидные последовательности приведены в GenBank, не содержат информации о точном месте и дате их выделения, а указывается только область или республика бывшего Советского Союза (табл. 3.2). И, наконец, более половины штаммов ВКЭ-Дв были выделены из клинического материала, а, как известно, большинство пострадавших от КЭ даже приблизительно затрудняются указать место нападения клеща.

Остается непонятным, почему занесенные на неэндемичные территории штаммы ВКЭ-Дв не образовывали стабильных очагов КЭ и элиминировались из вирусной популяции. Возможно, ответ на этот вопрос кроется в том, что для формирования очага необходимо некоторое критическое количество штаммов, достаточное для его поддержания продолжительное время. Вероятно, в случае интродукции животных количество вносимых штаммов было мало, вследствие чего штаммы ВКЭ-Дв элиминировались из природы за счет естественных причин (например, конкуренции с аборигенными штаммами ВКЭ-Сиб).

В литературе отсутствуют данные о длительной персистенции ВКЭ среди крупных животных без участия клещей и о возможной вертикальной передаче вируса между их поколениями, однако этот феномен показан для мелких грызунов [86, 87]. Считается, что основным источником поддержания вирусной популяции являются мелкие позвоночные животные, однако мы полагаем, что роль крупных млекопитающих и птиц в сохранении вирусной популяции природных очагов КЭ недооценена и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, случайно был поставлен непреднамеренный крупномасштабный эксперимент по распространению ВКЭ, который привел

к трагическим последствиям – заболеваемости и смертности людей от неэндемичных штаммов ВКЭ.

Предлагаемая гипотеза о распространении неэндемичных штаммов ВКЭ за счет переселения человеком диких млекопитающих и птиц, а также домашних животных, носит универсальный характер и позволяет объяснить как появление штаммов ВКЭ-Дв в Сибири, на Среднем Урале и Европейской части Советского Союза, так и появление ВКЭ-Ев в Восточной Сибири.

Для объяснения причин распространения отдельных представителей вирусов ККЭ высказывались предположения о том, что в основе их распространения лежит интродукция диких животных. Так, например, анализ нуклеотидных последовательностей штаммов вируса Повассан, изолированных на Дальнем востоке России, демонстрирует высокую степень генетической близости российских и канадских штаммов. Это обстоятельство является веским аргументом в пользу того, что канадские штаммы вируса Повассан попали на территорию России в середине двадцатого столетия, возможно, в результате акклиматизации американской норки, которая была импортирована из Канады для поддержания охотничье-промысловых хозяйств [207].

Следует отметить, что еще в 1993 году Алексеев А.А. предпринял попытку объяснить феномен выделения в 80-х годах прошлого столетия из клещей *I. ricinus*, сгустков крови больных людей, а также от мышевидных грызунов в предгорной и горной частях Крыма штаммов ВКЭ, более близких антигенному варианту *Soffin* (ВКЭ-Дв), нежели западному *Абсеттаров* (ВКЭ-Ев) [3]. Появление восточного варианта КЭ в Крыму он связывает с завозом крупных промысловых млекопитающих с Дальнего Востока в охотничьи хозяйства Крыма [20, 59].

Предлагаемая гипотеза позволяет объяснить и происхождение штаммов ВКЭ-Ев на территории Южной Кореи [191, 192]. Данные штаммы, выделенные в период с 2008 по 2013 годы, образуют филогенетически обособленную ветвь внутри ВКЭ-Ев и происходят, судя по всему, от одного предкового штамма [303]. Допуская, что скорость нуклеотидных замен, определенная для полного гена Е среди ВКЭ-Дв [275] и для фрагмента гена Е среди ВКЭ-Сиб (раздел 3.2), применима и для ВКЭ-Ев, то возраст корейских штаммов составляет примерно 83 и 95 лет соответственно. Таким образом, вероятное время появления штаммов ВКЭ-Ев на Корейском полуострове - первая половина XX века, и связано это, скорее всего, с завозом из Европы домашнего скота или (и) диких охотничье-промысловых животных морским путем или транзитом через Россию. Косвенным подтверждением такого сценария развития событий является обнаружение на Тайване боррелий *Borrelia burgdorferi* s.s., которые распространены исключительно в Северной Америке и Европе, но не в Азии [103].

Естественно предположить, что для каждого случая выявления штаммов ВКЭ, неэндемичных для данной территории, есть научное объяснение, однако оно может быть неочевидным. Предложенная гипотеза позволяет глубже взглянуть на данную проблему и расширить зону поиска необходимой информации. Несомненно одно – в подавляющем большинстве случаев появления неэндемичных субтипов ВКЭ лежит деятельность человека, а не природные факторы, связанные, например, с естественными миграциями зверей и перелетами птиц. Учитывая антропогенный фактор, можно не только выявлять пути распространения неэндемичных штаммов ВКЭ, но и прогнозировать места их возможного появления.

### ***3.3.2. Проблема «смены» генотипа вируса клещевого энцефалита на Среднем Урале за последние 60 лет***

В 2007 году в журнале *Вопросы вирусологии* вышла статья *Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя* [54]. В данной публикации авторы, основываясь на сравнении так называемых хронологических рядов штаммов ВКЭ, описали феномен изменения генотипического состава штаммов ВКЭ, выделенных в разные годы за почти 70-летний период на территории Свердловской области. На основании этого делается вывод о том, что в Свердловской области «за 60 лет произошли кардинальные изменения в структуре популяций ВКЭ: дальневосточный подтип, который доминировал в 40-е годы XX века, был замещен сибирским подтипом, занявшим его экологическую нишу». Гипотеза «смены» генотипов ВКЭ нашла отражение в ряде публикаций [10, 33, 38, 55].

Действительно, присутствие штаммов ВКЭ дальневосточного субтипа (ВКЭ-Дв) на территории Свердловской области в 40-х годах прошлого века и их исчезновение к настоящему времени – бесспорный научный факт. Однако, предлагаемая интерпретация данного факта не согласуется с общепринятым представлением о клинальном распространении штаммов ВКЭ в западном направлении по Евразийскому континенту [304]. Это противоречие вводит в заблуждение специалистов-эпидемиологов, создавая у них искаженное представление о закономерностях формирования природных очагов КЭ. Так, в Постановлении Главного санитарного врача РФ от 12 мая 2011 г. №53 «Об усовершенствовании эпидемиологического надзора и профилактических мероприятий в отношении клещевого вирусного энцефалита», можно прочесть следующее: «...результаты многолетних исследований в области молекулярной эпидемиологии КЭ с использованием штаммов, выделенных в разные годы (начиная от 40-х годов XX века до настоящего времени) и на различных территориях Российской Федерации, указывают на то, что за



последние 50-60 лет происходит смена дальневосточного генотипа вируса возбудителя КЭ на сибирский, что может оказать влияние на эффективность проводимых профилактических мероприятий» [46].

В настоящей работе приводится ряд аргументов, показывающих несостоятельность представления о смене генотипа ВКЭ на Среднем Урале.

**Аргумент 1.** Ранее путем сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е у 165 штаммов ВКЭ, выделенных в разные годы на территории Свердловской области, была установлена выраженная генетическая структура популяции штаммов ВКЭ-Сиб (раздел 3.2). Важным является тот факт, что штаммы, выделенные на территории Среднего Урала, представляют практически все генетическое разнообразие штаммов ВКЭ-Сиб, встречающихся как на Европейской части России и в Прибалтийских странах, так и в Восточной и Западной Сибири. Нами было показано, что возраст вирусной популяции составляет приблизительно 400 лет, т.е. первые штаммы ВКЭ-Сиб появились на Среднем Урале не ранее начала XVII века (раздел 3.2).

Исходя из этого, можно утверждать, что современная популяция штаммов ВКЭ-Сиб на территории Свердловской области формировалась на протяжении нескольких столетий, а не в последние 60 лет, как следует из выводов авторов обсуждаемой гипотезы.

**Аргумент 2.** Для обоснования концепции *смены* генотипов приводится следующий довод: «Причины смены подтипов ВКЭ могут быть связаны с комплексом экологических факторов, прежде всего с изменением экосистем вследствие антропогенной трансформации естественных ландшафтов. Интенсивная промышленная эксплуатация лесов, разнообразных природных ресурсов и другие виды хозяйственной деятельности и социальной активности привели к формированию производных лесов с новыми растительными группировками». На первый взгляд аргументация выглядит

логичной, однако не учитывается то обстоятельство, что наряду с вышесказанным происходили и обратные процессы. Так, по материалам информационно-справочной базы данных «Города и села Среднего Урала в XX веке», из 2807 постоянных населенных пунктов, расположенных в сельских районах Свердловской области, в 1930 - 1980-е гг. исчезли по разным причинам 1267 поселений, т.е. 45,1% [44]. Иными словами, на значительной территории Свердловской области антропогенно-трансформированные ландшафты возвращались к своему естественному состоянию как раз в то время, когда, по мнению авторов, происходила смена генотипов ВКЭ. Кроме того, отдельные территории области практически не подвергались промышленной эксплуатации в рассматриваемый период по причине своей экономической бесперспективности, например, Верхотурский, Байкаловский и ряд других районов области. Следовательно, на таких территориях должны были сохраниться многочисленные эндемичные очаги с циркуляцией штаммов ВКЭ-Дв. К настоящему времени среди изученных нами более 400 современных штаммов ВКЭ, выделенных в разных районах области (в том числе самых отдаленных и малонаселенных), ВКЭ-Дв был зафиксирован только в одном случае в 2007 году (Каменск-Уральский район), что составляет менее 0,3% от всех изученных штаммов. Последующие попытки обнаружить в том же районе штаммы ВКЭ этого генотипа были безуспешными.

Таким образом, приходится признать, что предлагаемое авторами теоретическое обоснование своей концепции не выдерживает критики при детальном рассмотрении.

**Аргумент 3.** В качестве ключевого доказательства смены генотипов ВКЭ приводятся результаты исследования фрагмента генома 23 штаммов, выделенных М.П. Чумаковым с сотрудниками в 1939-1945 гг. на территории Свердловской области: «Ретроспективное генотипирование этих штаммов показало абсолютное доминирование ВКЭ-Дв (22 (95,7%) из 23 штаммов)». К

сожалению, авторы статьи не приводят информацию о том, сколько из этих штаммов было выделено из природы, т.е. из клещей и мелких млекопитающих, а сколько из клинического материала. Однако, как минимум семь штаммов из этой группы, чей фрагмент генома впоследствии удалось расшифровать, были выделены от больных и погибших от КЭ людей. Отсюда можно сделать заключение о том, что значительная доля штаммов начала 40-х годов была получена из клинического материала. Нами была изучена коллекция штаммов ВКЭ Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций, собранная с 1966 по 1986 гг. Из 59 штаммов, выделенных на территории Свердловской области, 11 (18,6%) принадлежали ВКЭ-Дв, шесть из которых были выделены из клинического материала. Важно отметить, что пять из них были филогенетически близки вышеупомянутым штаммам 40-х годов [200]. Очевидно, что делать достоверные выводы о распределении генотипов ВКЭ на основе таких штаммов нельзя, т. к. выборка не является случайной. Известно, что КЭ, вызванный вирусами разных субтипов, может существенно отличаться по клиническому проявлению. Как правило, более тяжелые формы КЭ с наибольшей летальностью отмечаются у ВКЭ-Дв, тогда как для ВКЭ-Сиб характерны лихорадочные и менингеальные формы [26]. Объективно оценить распределение генотипов ВКЭ на отдельно взятой территории можно только по штаммам, выделенным из природного материала. С учетом этого обстоятельства, приводимые данные о доминировании ВКЭ-Дв на территории Среднего Урала в 40-е годы прошлого столетия уже не кажутся столь убедительными.

**Аргумент 4.** Обнаружение штаммов ВКЭ-Дв на территории Среднего Урала не было уникальным явлением. Ретроспективными исследованиями штаммы ВКЭ-Дв были зарегистрированы на территории европейских стран бывшего СССР - Украина, Латвия, Эстония, европейской части России - Вологодская, Ленинградская, Пермская области и Сибири - Кемеровская,

Новосибирская, Томская и Иркутская области [29, 30, 54, 129]. В разделе 3.3.1 показано, что наиболее вероятной причиной распространения неэндемичных штаммов ВКЭ стала реализация государственной «Программы по акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц». Таким образом, обнаружение ВКЭ-Дв на территории Среднего Урала могло быть результатом хозяйственной деятельности человека, а не показателем его изначального доминирования в структуре популяций ВКЭ на данной территории.

Очевидно, что применение метода сравнения *хронологических рядов* штаммов, хранящихся в коллекциях вирусов, для получения данных о ходе эволюционного процесса у ВКЭ является вполне оправданным. Однако делать выводы, полученные в результате такого сравнения, нужно крайне осторожно. Необходимо принимать во внимание множество факторов, которые могли повлиять на генотипический состав вирусных популяций, учитывать место и время, а также обстоятельства, при которых сравниваемые штаммы были выделены.

Подводя итог, можно с уверенностью утверждать, что проблемы смены генотипов не существует, есть только проблема нашего понимания причин, по которым штаммы ВКЭ-Дв заносились в прошлом на неэндемичные территории.

#### **3.4. Референсный штамм *Soffin* вируса клещевого энцефалита и проблема его аутентичности**

Вирус клещевого энцефалита был открыт в 1937 году на Дальнем Востоке России [22]. Первой научной экспедицией, возглавляемой проф. Л.А. Зильбером, было выделено 30 штаммов ВКЭ, однако к настоящему времени сохранилось только два из них: *Soffin* (*Софьин*) и *Обор-4* [54]. Традиционно первые из выделенных штаммов патогенных вирусов *de facto* становились референсными для проведения эпидемиологических, клинических и

фенотипических исследований. Часто такие штаммы становились основой для производства вакцин. Первым в списке таких штаммов для ВКЭ стал штамм *Soffin*, выделенный недалеко от оз. Ханка (Приморский край) из головного мозга молодой женщины, погибшей от очаговой формы КЭ [109]. Штамм был много раз пассирован на мышах и в культурах клеток и депонирован во многих вирусных коллекциях мира. В десятках научных исследований штамму *Soffin* отводится роль прототипного штамма, относительно которого сравниваются фенотипические, например, антигенные, и молекулярно-генетические характеристики вновь выделенных лабораторных и вакцинных штаммов ВКЭ. Кроме того, этот штамм на протяжении многих лет является основой производства инактивированной вакцины КЭ на территории России. Он также является основой в разработке перспективной живой аттенуированной химерной вакцины [249]. Учитывая большое значение штамма *Soffin*, неудивительно, что он стал первым штаммом ВКЭ, чей геном был секвенирован [52, 251]. Фрагмент его нуклеотидной последовательности размещен в GenBank под номером X07755 [52, 250, 299]. Спустя 13 лет геном этого штамма был повторно секвенирован группой японских ученых, и из-за существенных различий штамм был назван *Soffin-HO* AB062064 [164]. Наконец, в 2011 году полная геномная последовательность штамма *Soffin* была размещена в GenBank под названием *Soffin-Ru* (JN229223). Кроме того, независимыми научными группами были определены нуклеотидные последовательности отдельных фрагментов генома: в 1997 году – гена NS5 штамма *Soffin* (AF013399) из коллекции арбовирусов Центра по контролю и предупреждению заболеваний, США [202], и в 2010 году – гена Е этого штамма – *SoffinKGG* (GU121963) [201]. Сравнительный генетический анализ этих последовательностей между собой на уровне целого генома или его

фрагментов обнаруживает существенные различия, которые могут значительно превышать таковые, наблюдаемые между отдельными штаммами ВКЭ в пределах субтипа. Сложилась парадоксальная ситуация, при которой сразу несколько штаммов претендуют на роль прототипного, что в конечном итоге может привести к путанице и искажению результатов при проведении молекулярно-эпидемиологических исследований. В настоящей работе мы попытались разобраться в возникшей проблеме, понять причины ее появления и установить подлинность штамма *Soffin*.

Для того чтобы решить проблему аутентичности одного из штаммов *Soffin*, мы провели полногеномное секвенирование штамма *Soffin* из коллекции Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций. Этот штамм был нами назван *SoffinKSY*, для того чтобы отличить его от других штаммов *Soffin*. В данном исследовании был взят следующий вирусологический материал: 1) штамм *SoffinKSY* из вирусной коллекции Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций. Этот штамм был официально получен в 1974 году из Всесоюзной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Ивановского (Москва, Россия). Штамм хранился в лиофилизированном виде и был трижды пассирован на мышах-сосунках перед исследованием; 2) штамм *Soffin VT1999* из инактивированной вакцины КЭ (номер партии С45-7 К3354, год выпуска - 1999) производства ФГУП НПО «Вирион» (Томск, Россия); 3) штамм *SoffinVM2001* из инактивированной вакцины КЭ (номер партии С705, год выпуска 2001) производства НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов (Москва, Россия). Информация обо всех штаммах *Soffin* представлена в таблице 3.2.

#### *Организация генома*

Геном штамма *SoffinKSY* (номер доступа в GenBank JF819648) длиной 10,703 нт состоит из 5'-НТО (131 нт), открытой рамки считывания (ОРС),

(10,245 нт), и 3'-НТО (327 нт). ОРС кодирует один полипротеин длиной 3414 а.о., который подвергается гидролизу клеточными и вирусными протеазами на три структурных (С, preM и E) и семь неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5). Количественное соотношение нуклеотидов в геноме штамма *SoffinKSY* составило: А = 25,03%, G = 31,31%, U = 21,23% и С = 22,43%. В целом, организация генома штамма *SoffinKSY* подобна ранее показанной для других известных штаммов ВКЭ.

#### Филогенетический анализ

Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей полипротеина штамма *SoffinKSY* со штаммами *Soffin-HO* и *Soffin-P* показало идентичность 97,2% (98,9% по аминокислотной последовательности) и 97,2% (98,3%) соответственно. Сравнение последовательности полипротеина штамма *SoffinKSY* с другими штаммами *Soffin* выявило многочисленные уникальные аминокислотные замены (Рис. 3.9). Таким образом, различия между штаммами *Soffin* сравнимы с таковыми между отдельными штаммами ВКЭ-Дв (эволюционные дистанции между штаммами показаны в виде длины ветвей филогенетического древа на рисунке 3.9). Исходя из этого, мы пришли к заключению о том, что нуклеотидная последовательность штамма *SoffinKSY* является уникальной и неродственной другим штаммам *Soffin*. В то же время 99,5% (99,3%) идентичности нуклеотидной и аминокислотной последовательностей штаммов *Soffin-P* и недавно изученным штаммом *Soffin-Ru* указывает на то, что оба эти штамма имеют общее происхождение. Вследствие близкого родства этих штаммов в дальнейшем они будут обозначаться как *Soffin-P/Soffin-Ru*.

Таблица 3.2 Информация и обозначения для всех штаммов Sofjin.

Название штамма	№ доступа GenBank	Обозначение штаммов в статье	Ген	Место хранения штамма	Место секвенирования	Ссылки
Sofjin	X07755	Фрагмент (С, М. Е, NS1)	Фрагмент (С, М. Е, NS1)	ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» (ИПВЭ), Москва, Россия	Институт биоорганической химии, Новосибирск, СССР	[250]
Sofjin	AF013399	Sofjin-P	Полный геном	Москва, Россия		[251]
Sofjin	AF013399	SofjinCDC	Ген NS5	ФГБУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», Москва, Россия	Центры по контролю и профилактике заболеваний, США	[202]
Sofjin-NO	AB062064	Sofjin-NO	Полный геном	Неизвестно	Национальный институт Здоровья, Япония	[164]
SofjinKGG	GU121963	SofjinKGG	Ген E	ФГБУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», Москва, Россия	ФГБУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», Москва, Россия	[201]
SofjinKSY	JF819648	SofjinKSY	Ген E	Институт вирусологии им Д.И. Ивановского, Москва, СССР →(1974)** НИИ вирусных инфекций, Екатеринбург, Россия	Уральский федеральный университет (УрФУ), Екатеринбург, Россия	Данная работа
SofjinKSY	JF819649	SofjinKSY	NS5 фрагмент			
SofjinVT1999	JF819650	SofjinVT1999	Ген E	«НПО «Вирион» - филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Томск	УрФУ, Екатеринбург, Россия	Данная работа
SofjinVM2001	JF819651	SofjinVM2001	Ген E	ФГБУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», Москва, Россия	УрФУ, Екатеринбург, Россия	Данная работа
Chimeric TBE/Dengue virus	FJ828987	Sofjin-P-Chimera	Ген E	ФГБУ «ИПВЭ им. М.П. Чумакова», Москва, Россия → (1983) Институт биоорганической химии, Новосибирск, Россия	Институт аллергологии и инфекционных заболеваний, США	[249]

\* Последовательность не представлена в GenBank. Данная последовательность приведена в публикации [251]

\*\* Штамм был передан из одной организации в другую, в скобках указан год передачи.



Филогенетическое дерево, построенное на основе полипротеин-кодирующей последовательности, подтверждает вышесказанное и однозначно демонстрирует, что штаммы *SoffinKSY*, *Soffin-P/Soffin-Ru* и *Soffin-HO* являются неродственными штаммами ВКЭ-Дв, принадлежащими одной группе штаммов, выделенных на территории Приморского края (Рис. 3.10). Аналогичные филогенетические деревья были построены на основе нуклеотидных последовательностей, кодирующих три структурных и семь неструктурных белков (Рис. 3.10, 3.11, Приложение V). 5'- и 3'-НТО не были включены в исследование из-за низкой информативности [71, 105, 289].

	C							preM							E										NS1									
	43	50	54	61	64	97	111	176	181	246	251	258	266	347	433	451	508	540	597	638	643	740	743	759	780	815	856	880	883	903	909	951	1122	
205	M	V	A	S	N	S	I	V	F	I	V	T	I	D	A	K	R	Q	T	I	T	M	A	G	C	P	A	G	R	V	R	P	V	
Sofjin-P	.	.	.	.	K	.	L	.	S	V	.	.	V	.	.	R	K	.	I	M	.	V	V	S	.	L	V	S	K	.	L	S	.	
Sofjin-Ru	.	.	.	.	K	.	L	.	.	V	.	.	V	.	.	R	K	.	I	.	.	V	V	S	.	.	V	.	K	.	L	S	.	
Sofjin-HO	L	.	V	.	K	.	L	.	.	M	.	.	V	.	V	.	K	.	I	.	.	V	V	S	G	.	.	.	K	.	.	S	I	
SofjinKSY	.	I	.	A	K	A	L	A	.	M	A	A	V	N	V	.	K	H	I	.	I	V	V	S	.	.	.	.	K	I	.	S	.	

	NS2a					NS2b			NS3							NS4a			NS4b															
	1152	1296	1297	1298	1311	1346	1352	1353	1378	1491	1551	1673	1707	1731	1750	1860	1861	1869	1871	1989	2052	2144	2165	2173	2191	2283	2314	2331	2344	2347	2349	2457	2458	
205	V	I	A	H	Y	L	A	I	M	D	S	S	T	N	A	I	V	T	R	I	N	E	A	A	M	L	M	V	A	F	I	S	A	
Sofjin-P	.	T	V	.	C	V	T	V	I	G	.	T	I	.	S	S	A	.	I	.	.	.	V	.	.	.	.	I	A	.	.	V	.	P
Sofjin-Ru	.	T	V	.	C	.	.	V	I	.	.	T	I	.	S	.	A	.	.	.	.	V	.	.	.	.	I	A	.	.	V	.	.	
Sofjin-HO	.	T	V	.	C	.	.	.	.	G	Y	T	I	S	.	.	A	A	.	.	.	V	G	.	.	V	I	A	.	L	V	A	.	
SofjinKSY	A	.	V	Q	C	.	.	.	.	.	Y	I	I	.	S	.	A	.	.	T	S	Q	V	.	T	.	I	A	S	.	V	.	.	

	NS4b					NS5																										
	2469	2472	2496	2526	2556	2614	2615	2617	2625	2641	2666	2695	2704	2737	3014	3030	3033	3040	3074	3152	3187	3188	3207	3235	3258	3260	3302	3338	3343	3378	3384	3407
205	R	V	L	K	R	Y	T	G	R	M	V	V	I	V	F	Y	E	G	R	L	G	R	E	A	W	I	T	S	V	A	R	L
Sofjin-P	E	A	C	.	K	C	A	A	K	.	.	A	T	I	S	H	G	.	K	.	S	G	D	T	R	V	A	.	A	.	K	S
Sofjin-Ru	.	A	.	.	K	.	.	.	K	.	.	.	.	I	S	H	G	S	K	S	S	.	.	T	R	V	.	N	A	S	K	.
Sofjin-HO	.	A	.	R	.	.	.	.	K	V	.	.	.	.	S	H	G	.	K	.	S	G	.	.	.	V	.	.	A	.	K	.
SofjinKSY	.	A	.	.	.	.	.	.	K	.	M	.	.	.	S	H	G	.	K	.	S	G	.	.	.	V	.	.	A	S	K	.

Рис. 3.9. Различия в аминокислотной последовательности полипротеина ВКЭ между штаммами *SoffinKSY*, *Soffin-HO*, *Soffin-P* и *Soffin-Ru* (показаны только вариабельные позиции). Штамм 205 был взят в качестве референсного. Аминокислоты, уникальные для штамма *SoffinKSY*, отмечены жирным шрифтом.

Поскольку в GenBank находятся различные фрагменты генома штамма *Sofjin*, мы включили их в сравнительный анализ по отдельным генам, таким как ген, кодирующий гликопротеин Е и фрагмент гена NS5.

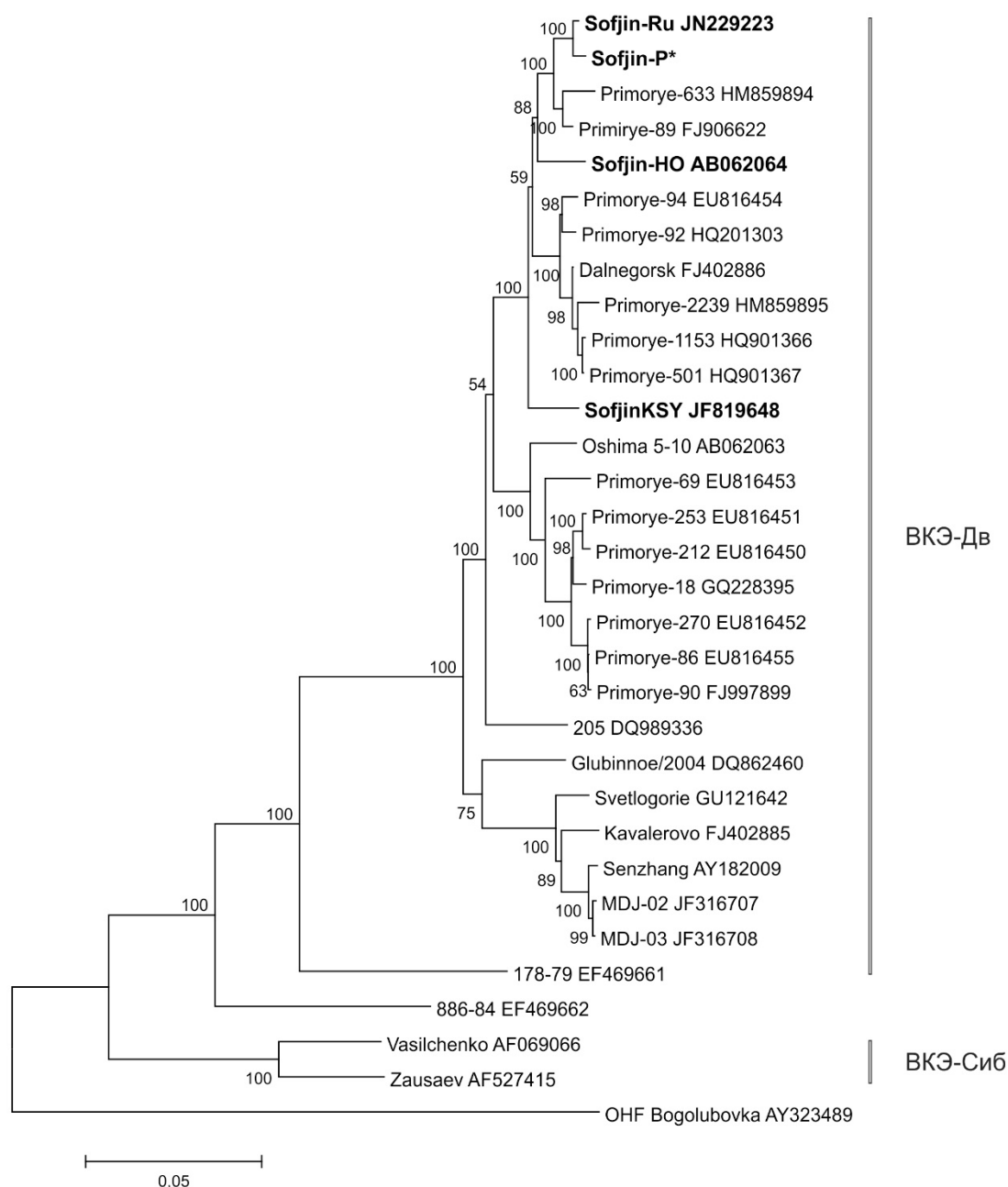


Рис. 3.10. Филогенетическое дерево, построенное на основе полипротеин-кодирующей последовательности (10,245 нт), штамма *SofjinKSY* и других известных штаммов ВКЭ-Дв. В качестве внешней группы использована последовательность вируса Омской геморрагической лихорадки.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена Е штамма *SoffinKSY* и двух вакцинных штаммов с последовательностями ВКЭ-Дв, представленными в GenBank, обнаружил три филогенетически обособленные группы, включающие штаммы *Soffin* (Рис. 3.11Б). Нуклеотидная последовательность гена Е штамма *SoffinKSY* показала максимальную идентичность (99,7%) со штаммом *SoffinKGG*. Вакцинные штаммы *SoffinVT1999* и *SoffinVM2001* также оказались близки (99,1% и 98,7%) штамму *SoffinKGG* (Рис. 3.11А). Генетические различия вакцинных штаммов по сравнению со штаммом *SoffinKGG* составили 14-19 нуклеотидов, что, тем не менее, не позволяет усомниться в общем происхождении данной группы (Рис. 3.11). В тоже время сравнение вакцинных штаммов с *Soffin-P/Soffin-Ru* и *Soffin-HO* выявило от 32 до 40 нуклеотидных замен (97,3 и 97,8% идентичности) соответственно. Таким образом, штаммы *SoffinKGG*, *SoffinKSY*, *SoffinVT1999* и *SoffinVM2001* образуют первую группу штаммов *Soffin*, связанных общим происхождением. Так как штамм *SoffinKGG* является коллекционным штаммом, хранящимся в Институте полиомиелита и клещевых энцефалитов им. М.П. Чумакова, вероятно, он является прототипным штаммом для этой группы. Вторая группа представлена только одним штаммом *Soffin-HO*. Наконец, третья группа состоит из штамма *Soffin-P*, его производного штамма химерного *TBE/Dengue* вируса FJ828987 (в дальнейшем *Soffin-P-Chimera*) и *Soffin-Ru*. Сравнительный анализ последовательностей гена Е штаммов, принадлежащих различным группам, показал значительные генетические различия (Рис. 3.11).

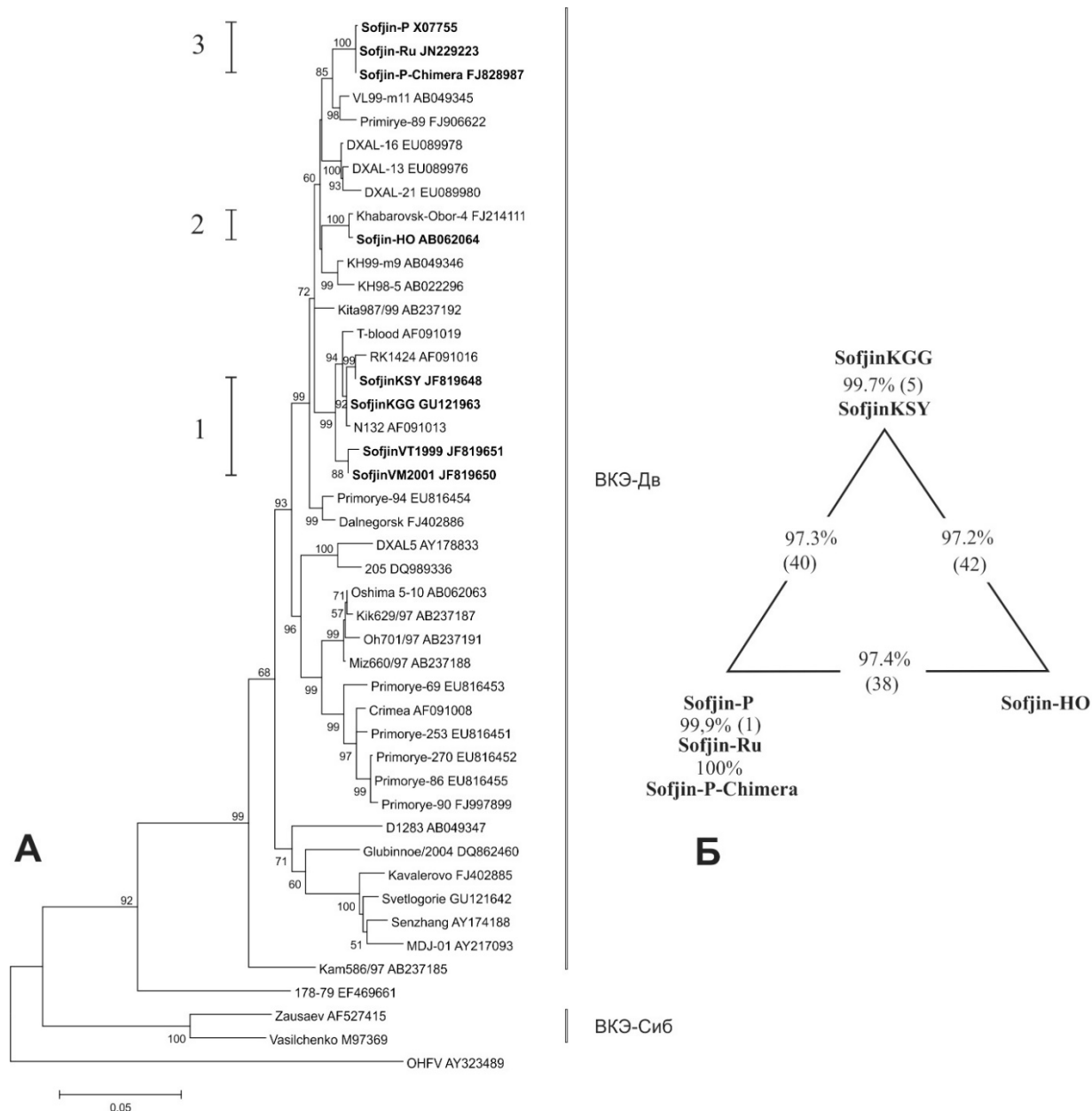


Рис. 3.11. Филогенетический анализ гена Е штаммов ВКЭ-Дв. **А.** Филогенетическое дерево (длина последовательностей – 1488 н.п.). Цифрами выделены филогенетические группы штаммов *Sofjin*. **Б.** Попарные значения идентичности групп последовательностей штаммов *Sofjin* в процентах, в скобках – число нуклеотидных замен.

Также нами был проведен анализ фрагмента консервативного гена NS5 штаммов *Sofjin-P*, *Sofjin-HO*, *Sofjin-Ru*, *SofjinKSY*, а также штамма, обозначенного *SofjinCDC* (AF013399). Последовательность NS5 штамма *SofjinCDC*, хранящегося в коллекции арбовирусов Центра по контролю и предупреждению заболеваний (США), показала филогенетическую близость

(99,9% идентичности) к последовательности штамма *SoffinKSY* (Рис. 3.12А). Учитывая данный факт, а также ранее показанное близкое родство штаммов *SoffinKGG* и *SoffinKSY* на основе гена E, логично предположить, что штамм *SoffinCDC* также родственен штамму *SoffinKGG* и принадлежит первой группе штаммов *Soffin*. Идентичность по фрагменту гена NS5 между штаммами *Soffin-HO*, *Soffin-P* и *SoffinKSY* (*SoffinCDC*) составляет около 97,9% (Рис. 3.12Б). Таким образом, на основе анализа различных участков генома можно сделать однозначный вывод о том, что в GenBank размещены последовательности трех самостоятельных групп штаммов ВКЭ-Дв с названием *Soffin*.

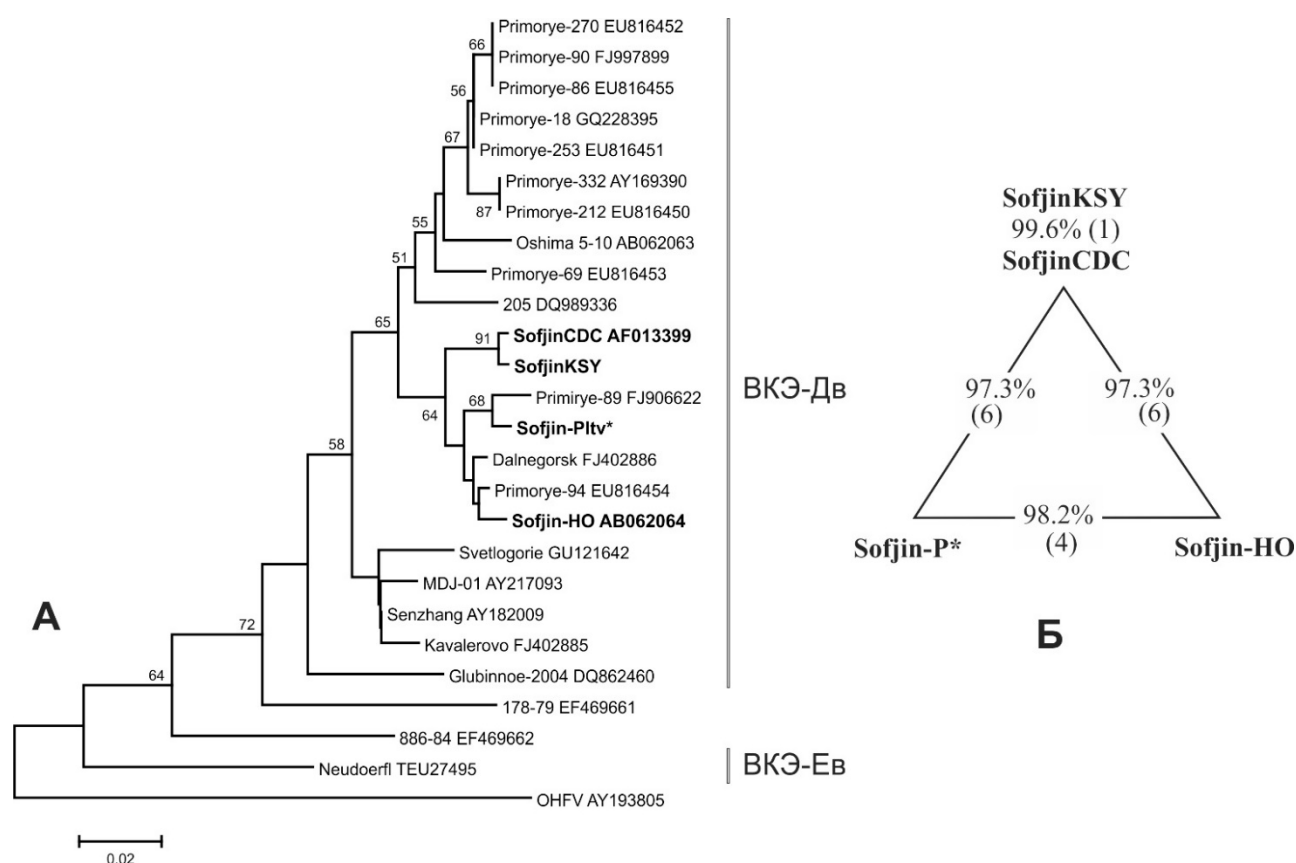


Рис. 3.12. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена NS5 ВКЭ-Дв. **А.** Филогенетическое дерево (длина последовательностей – 1026 н.п.) **Б.** Попарные значения идентичности нуклеотидных последовательностей четырех штаммов *Soffin* в процентах, в скобках - число нуклеотидных замен. \* - последовательность для этого штамма взята из работы [251].

Анализ полной геномной последовательности штамма *SoffinKSY* и последовательностей гена Е двух вакцинных штаммов (*SoffinVT1999* и *SoffinVM2001*), а также последовательностей штамма *Soffin* из GenBank показал, что по крайней мере три различных штамма претендуют на роль референсного. Столь выраженная генетическая дивергенция между тремя штаммами *Soffin* могла возникнуть вследствие двух наиболее вероятных причин. Первая – они происходят от одного исходного штамма *Soffin*, выделенного в 1937 году, и их генетические различия вызваны микроэволюционными процессами вследствие многочисленных пассажей на мышах и в культурах клеток на протяжении длительной пассажной истории. Известно, что ВКЭ способен сравнительно быстро, за 4-8 пассажей, изменять свои генетические и фенотипические свойства при адаптации к модельным системам – культурам клеток или лабораторным животным [222, 262]. Вторая причина – эти штаммы не имеют общего происхождения, а являются самостоятельными штаммами дальневосточного субтипа. Они были отнесены к штамму *Soffin* ошибочно, либо вследствие кросс-контаминации, либо в результате лабораторной ошибки.

Для проверки первого предположения мы сравнили нуклеотидную последовательность гена Е штаммов *SoffinVT1999* и *SoffinVM2001* из инактивированной вакцины ВКЭ. Наблюдаемая генетическая изменчивость вакцинных штаммов (14 и 19 нуклеотидных замен по сравнению с прототипным штаммом *SoffinKGG*), по всей вероятности, связана с адаптацией вируса к мышам и культуре клеток куриного эмбриона в результате большого количества пассажей. Тем не менее, несмотря на высокую генетическую вариабельность, вакцинные штаммы сохраняют равноудаленность по числу нуклеотидных замен от штаммов *Soffin-P/Soffin-Ru* и *Soffin-HO*, как и исходный штамм *SoffinKGG*. Это дает основание предполагать, что большое количество

пассажей не приводит к значительным изменениям в филогенетических отношениях между штаммами ВКЭ.

Согласно второй гипотезе о независимом происхождении штаммов *Soffin*, наиболее вероятным объяснением является контаминация аутентичного штамма *Soffin* посторонним штаммом дальневосточного субтипа с последующим вытеснением первого в результате многочисленных пассажей (кросс-контаминация). Кроме того, не может быть исключена случайная подмена одного штамма другим. Такие случаи в лабораторной практике встречаются довольно часто. В частности, ранее были приведены описанные в литературе примеры подобных случаев в отношении вирусов комплекса клещевого энцефалита (раздел 1.2.2).

Естественно, возникает важный вопрос о подлинности одного из трех штаммов *Soffin*, который имеет отношение к событиям, связанным с открытием вируса клещевого энцефалита в 1937 году.

К сожалению, нам не удалось проследить начальный этап истории штамма *Soffin-HO*. Известно лишь, что данный штамм попал в Национальный Институт Здоровья Японии более 40 лет назад, то есть до 1970 года, и из-за различий в нуклеотидной последовательности его генома с ранее изученным штаммом *Soffin-P* был назван *Soffin-HO* (I. Takashima, персональное сообщение). Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности гена Е показывает, что штамм *Soffin-HO* идентичен на 99,7% штамму *Khabarovsk-Obor-4* FJ214111 (Рис. 3.11А). Штамм *Khabarovsk-Obor-4* (оригинальное название штамма *Обор-4*) был выделен экспедицией Зильбера в 1937 году и долгое время наряду со штаммом *Soffin* имел статус прототипного. Он активно использовался в вирусологических исследованиях [148], на его основе была приготовлена одна из первых экспериментальных инактивированных вакцин КЭ, однако впоследствии предпочтение было отдано штамму *Soffin*. Таким образом, вероятно, что штамм *Soffin-HO* является

не чем иным, как штаммом *Khabarovsk-Obor-4*, ошибочно отнесенным к штамму *Soffin*.

Штамм *Soffin-P* является самым первым из всех штаммов ВКЭ, фрагмент генома которого был определен еще 1986 году. Важно отметить, что данный штамм был взят для секвенирования как лабораторный, а не как коллекционный штамм [250]. Как было показано выше (разд. 1.2.2), вероятность кросс-контаминации у лабораторных штаммов достаточно высока. Часть генома штамма *Soffin-P-Chimera* оказалась полностью идентична штамму *Soffin-P*, за исключением одной синонимической замены в гене E (Рис. 3.11Б). Принимая во внимание одно и то же место хранения и секвенирование генома штаммов *Soffin-P* и *Soffin-Ru* (табл. 3.2), мы приходим к выводу, что штамм *Soffin-Ru* является штаммом *Soffin-P*, чей геном был секвенирован повторно спустя 25 лет. Некоторые различия между нуклеотидными последовательностями (четыре делеции в регионе, кодирующем полипротеин, усеченный 3'-НТО и вставка в два нуклеотида в 5'-НТО у *Soffin-P* [251]), возможно, появились в результате ограничений (несовершенства) ручного метода секвенирования. Учитывая это, а также тот факт, что нуклеотидные последовательности генома данного штамма не были получены другими исследователями, мы пришли к заключению, что данный штамм также не является аутентичным.

Особое внимание заслуживает первая группа штаммов *Soffin*, в которую входят несколько штаммов, связанных общим происхождением. Прежде всего, заслуживают большого доверия источники получения этих штаммов. Так, штамм *SoffinCDC* был передан в коллекцию арбовирусов CDC в 1985 году непосредственно участниками первой экспедиции на Дальний Восток М.П. Чумаковым и Е.Н. Левкович [109]. Штамм *SoffinKSY* был получен из Всесоюзной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Ивановского в 1974 году по официальному запросу Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций. И,



наконец, штамм *SoffinKGG* был получен в 70-е годы из коллекции вирусов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов (Карганова Г.Г. – персональное сообщение). Все эти штаммы имели минимальное количество пассажей и до секвенирования хранились в жидком азоте или в лиофилизированном виде. Кроме того, штаммы *SoffinVT1999* и *SoffinVM2001* от двух конкурирующих производителей вакцин клещевого энцефалита также принадлежат этой группе штаммов *Soffin*. Важно отметить, что нуклеотидные последовательности фрагментов генома этих штаммов были получены тремя независимыми научными группами. Подводя итог вышесказанному, мы приходим к заключению, что группа штаммов *SoffinCDC*, *SoffinKGG* и *SoffinKSY*, включая два вакцинных штамма, ведет свое происхождение от подлинного (аутентичного) штамма *Soffin*. Таким образом нуклеотидная последовательность полного генома штамма *Soffin*, выделенного первой Дальневосточной экспедицией в 1937 году, только сейчас стала известна.

Справедливость вывода о подлинности именно первой группы штаммов *Soffin* впоследствии была подтверждена Терехиной Л.Л. с соавторами, когда в 2013 году был секвенирован полный геном штамма *Soffin-Chumakov* (KC806252). Этот штамм, заложенный на хранение в лаборатории М.П. Чумакова в 1962 году, имел всего четыре пассажа на мышах. Сравнительный анализ показал минимальные различия между геномами штаммов *Soffin-Chumakov* и *SoffinKSY* (6 нуклеотидных замен).

Установление подлинности одного из штаммов *Soffin* позволит стандартизовать вирусологические, молекулярно-эпидемиологические и филогенетические исследования ВКЭ. Кроме того, это поможет понять причины вспышки КЭ на Дальнем Востоке в 1935-1937 годах.

Проведенное исследование по установлению подлинности штамма *Soffin* поднимает важную проблему, связанную с необходимостью обязательного подтверждения молекулярно-генетическими методами

соответствия лабораторных штаммов аутентичным коллекционным образцам.

Анализ научной литературы последних лет показывает, что случаи возможной кросс-контаминации и (или) лабораторной ошибки при работе с вирусами происходили или происходят и в настоящее время. Так, например, в работе Козловской Л.И. с соавторами в качестве одного из объектов исследования был взят штамм ВКЭ 80к, выделенный в 1969 году в Свердловской области, который на основе секвенирования гена Е вирусного генома (GU121965) был отнесен к дальневосточному субтипу ВКЭ [201]. Однако, годом ранее на основе анализа фрагмента того же гена (GU444154) было показано, что этот штамм, находящийся в коллекции Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций, принадлежит к ВКЭ-Сиб (раздел 3.2). Проведенный сравнительный анализ выявил полную идентичность нуклеотидной последовательности фрагмента гена Е штамма 80к со штаммом 4072 ВКЭ-Дв (NM008979), изолированного в 1966 году в городе Серов Свердловской области от больного КЭ [200]. Правильность этого вывода была подтверждена независимой группой исследователей из Новосибирска, определивших полную нуклеотидную последовательность штамма 4072 (KF951037). Таким образом, штамм 80к является штаммом 4072. Нельзя также оставить без внимания появившееся недавно «сенсационное» сообщение международной группы ученых о выделении во второй половине 20-го века на Дальнем Востоке (Приморский край) трех штаммов вируса ШЭО. Анализ нуклеотидных последовательностей гена Е показал, что эти штаммы филогенетически весьма близки штамму *Negishi*, выделенному в Японии в 1948 году. На этом основании авторы делают вывод о том, что в середине прошлого века произошел единичный случай интродукции вирусов ШЭО (*Negishi*-подобных) в Японию и Приморский край из одного естественного (европейского) природного очага [206]. С этим можно было бы согласиться, но

лишь при условии обсуждения вопроса об исключении возможности кросс-контаминации и (или) лабораторной ошибки, а в качестве доказательства приведения нуклеотидной последовательности гена Е лабораторного штамма ШЭО, используемого в практике вирусологических работ в то время, когда были выделены эти штаммы.

Основываясь на вышесказанном, мы предлагаем в обязательном порядке передавать штаммы из вирусных коллекций для научных исследований и производства с описанием не только общепринятых фенотипических характеристик, но и с генетическим паспортом по одному или нескольким участкам генома. Кроме того, мы считаем крайне важным введение внутреннего контроля, основанного на генетической идентификации всех музейных и вакцинных штаммов ВКЭ с целью устранения проблем, связанных с кросс-контаминацией и (или) лабораторными ошибками.

### **3.5. Исследование генетической структуры клещей *I. persulcatus* как возможного фактора, определяющего генетическую изменчивость вируса**

Клещи *Ixodes persulcatus* являются переносчиками многочисленных возбудителей болезней человека (клещевой энцефалит, боррелиозы, анаплазмозы и т.д.). Ареал *I. persulcatus* простирается от Прибалтики по всей зоне тайги до Российского Дальнего Востока, а также включает Японию, север Китая, Монголии и Казахстана (Рис. 3.13).



Рис. 3.13. Ареал клещей *Ixodes persulcatus*. Черными кружками обозначены места сбора образцов клещей для данного исследования.

К настоящему времени накоплен значительный фактический материал относительно морфологии, особенностей биологии и экологии *I. persulcatus*. Более того, были сделаны попытки изучить внутривидовую структуру таежного клеща на основе сравнения морфологических показателей [65]. Филиппова Н.А. в своей работе указывает на трудности изучения географической изменчивости данного вида, связанные с обширностью ареала и сложностью его формирования, а также несогласованностью данных по изменчивости морфологических структур клещей на разных стадиях развития [65]. Кроме того, морфологические признаки в целом могут иметь сложный характер наследования и часто зависят от условий внешней среды. В связи с чем в настоящее время широко используются молекулярно-генетические маркеры различного уровня вариабельности. Генетические маркеры нашли свое применение в систематике клещей, изучении изменчивости как на меж-, так и на внутривидовом уровне [241]. Были

проведены масштабные исследования близких видов клещей комплекса *Ixodes ricinus* [101, 244], что позволило провести сравнительный анализ генетической структуры и понять процессы, лежащие в основе расселения популяций клещей. Однако, относительно структуры популяций клещей *I. persulcatus* имеется крайне мало данных. В связи с этим особого внимания заслуживает работа McLain D.K. с соавторами, показывающая наличие исключительной гетерогенности и географической структуры популяций данного вида по последовательности нуклеотидов варибельного сегмента D3 28S рРНК [227], а также значительное отличие вторичной структуры данного участка по сравнению с клещами комплекса *I. ricinus* [226]. Подобная структура, по мнению авторов, свидетельствует о длительной и независимой эволюции популяций *I. persulcatus*. Так как переносимые *I. persulcatus* патогены также отличаются неоднородной генетической структурой (например, ВКЭ имеет сибирский и дальневосточный субтип), мы можем получить прекрасную основу для изучения коэволюционных процессов, происходящих в популяциях возбудителей и их переносчиков.

Поскольку работа McLain D.K. не включала в анализ клещей из центральной части ареала, в настоящей работе было решено восполнить этот недостаток и исследовать генетическую структуру *I. persulcatus* прежде всего на территории Среднего Урала и Западной Сибири, а также выборочно в некоторых регионах России. Для более корректного анализа был выбран дополнительный маркер – участок митохондриальной 12S рРНК, широко используемой в популяционно-генетических исследованиях иксодовых клещей [92, 101, 244]. В итоге мы получили неожиданные результаты, противоположные по отношению к данным McLain и заставившие нас пересмотреть сложившиеся взгляды на генетическую структуру и эволюцию *I. persulcatus*.

В ходе исследования были изучены 73 клеща, собранных в период с 2007 по 2009 год. Выборка была произведена таким образом, чтобы максимально возможно представить ареал вида (места сбора указаны на Рис. 3.13).

Подробная информация о месте сбора отдельных экземпляров, а также номера последовательностей участков их генов в GenBank представлены в таблице 3.3. Для сравнения был также взят один образец *I. pavlovskyi* с Дальнего Востока.

В результате были получены последовательности участков генов 28S (340 н.п.) и 12S рРНК (351 н.п.) 25 и 76 клещей соответственно. Вопреки данным McLain D.K., была показана полная идентичность последовательностей варибельного сегмента D3 28S рРНК особей *I. persulcatus* на всем изученном ареале. Используя полученную последовательность и последовательности других клещей комплекса *I. ricinus* из GenBank, была построена дендрограмма, отражающая эволюционное положение *I. persulcatus* (Рис. 3.14). Показано, что D3 сегмент *I. persulcatus* практически идентичен последовательностям других видов рода *Ixodes*, в частности *I. ricinus* (FR874103), *I. scapularis* (FR874102) и *I. pavlovskyi* (JQ085392), отличаясь от них не более чем на две нуклеотидные замены (Рис. 3.14 А).

Для проведения сравнительного анализа нами были построены модели вторичной структуры D3 сегмента *I. persulcatus* на основе наших данных и данных работы McLain D.K., также была предсказана модель данного сегмента для мыши и аскомицета *Cordyceps scarabaeicola* (Рис. 3.15). Предсказанные структуры соответствуют общей модели D3 сегмента эукариот [230]. При этом полученная в данном исследовании вторичная структура *I. persulcatus* представлена H14 – стеблем и 4 стеблями D3 – сегмента (S1-S4), что соответствует моделям D3 сегмента как других видов *I. ricinus* комплекса [226], так и млекопитающих (мышь) (Рис. 3.15). В то же время, в соответствии с McLain D.K., в D3 сегменте *I. persulcatus* произошла делеция в 60 нуклеотидов и утеря S4-стебля, вследствие чего его вторичная структура ближе к таковым грибам – аскомицетов, также имеющих 3 петли (S1-S3) (Рис. 3.15).

Таблица 3.3

Клещи и места их сбора, а также номера доступа нуклеотидных последовательностей, размещенных в GenBank

Место	28S рРНК		12S рРНК		Гаплотип
	Номер GenBank	Кол-во, пол и стадия развития*	Номер GenBank	Кол-во, пол и стадия развития*	
Ixodes persulcatus					
Алтай, Южная Сибирь	JQ085390	1♂, имаго	JQ085385	1♂, имаго	1
Алтай, Южная Сибирь	JQ085390	1♀, имаго	JQ085386	1♀, имаго	4
Иркутск, Восточная Сибирь	HM234635	2♀, имаго	HM234626	2♀, имаго	1
Ханты-Мансийск, Западная Сибирь	HM234639	2♀, имаго	HM234630	2♀, имаго	1
Киров, Европейская часть России	JQ085389	2♀, имаго	JQ085384	2♀, имаго	1
Красноуфимск, Средний Урал	-	-	HM234620	2♀, имаго	1
Курган, Западная Сибирь	HM234636	2♀, имаго	HM234627	2♀, имаго	1
Омск, Западная Сибирь	HM234637	1♀, имаго	HM234628	2♀, имаго	1
Санкт-Петербург, Европейская часть России	JF357623	2, имаго	JF412293	7, имаго	1
Сахалин, Дальний Восток	HM234638	1♀, 2 нимфы	HM234629	3♀, имаго	1
Серов, Средний Урал	-	-	HM234621	2♀, имаго	1
Тавда, Западная Сибирь	HM234633	3♀, имаго	HM234624	1♂, имаго	3
Тавда, Западная Сибирь	-	-	HM234623	6♀, 4♂, имаго	1
Тавда, Западная Сибирь	-	-	HM234622	1♀, имаго	2
Тюмень, Западная Сибирь	HM234640	1♀, 1♂, имаго	HM234631	2♀, 1♂, имаго	1
Уфа, Южный Урал	HM234632	1♀, имаго	HM234619	3♀, имаго	1
Владивосток, Дальний Восток	JQ085391	2♀, имаго	JQ085387	2♀, имаго	1
Екатеринбург, Средний Урал	HM234634	1♀, имаго	HM234625	21♀, 8♂, имаго, 1 нимфа	1
Ixodes pavlovskyi					
Владивосток, Дальний Восток	JQ085392	1♀, имаго	JQ085388	1♀, имаго	

\* Указано общее число клещей, проанализированных для определенного места, и имеющих идентичную последовательность.

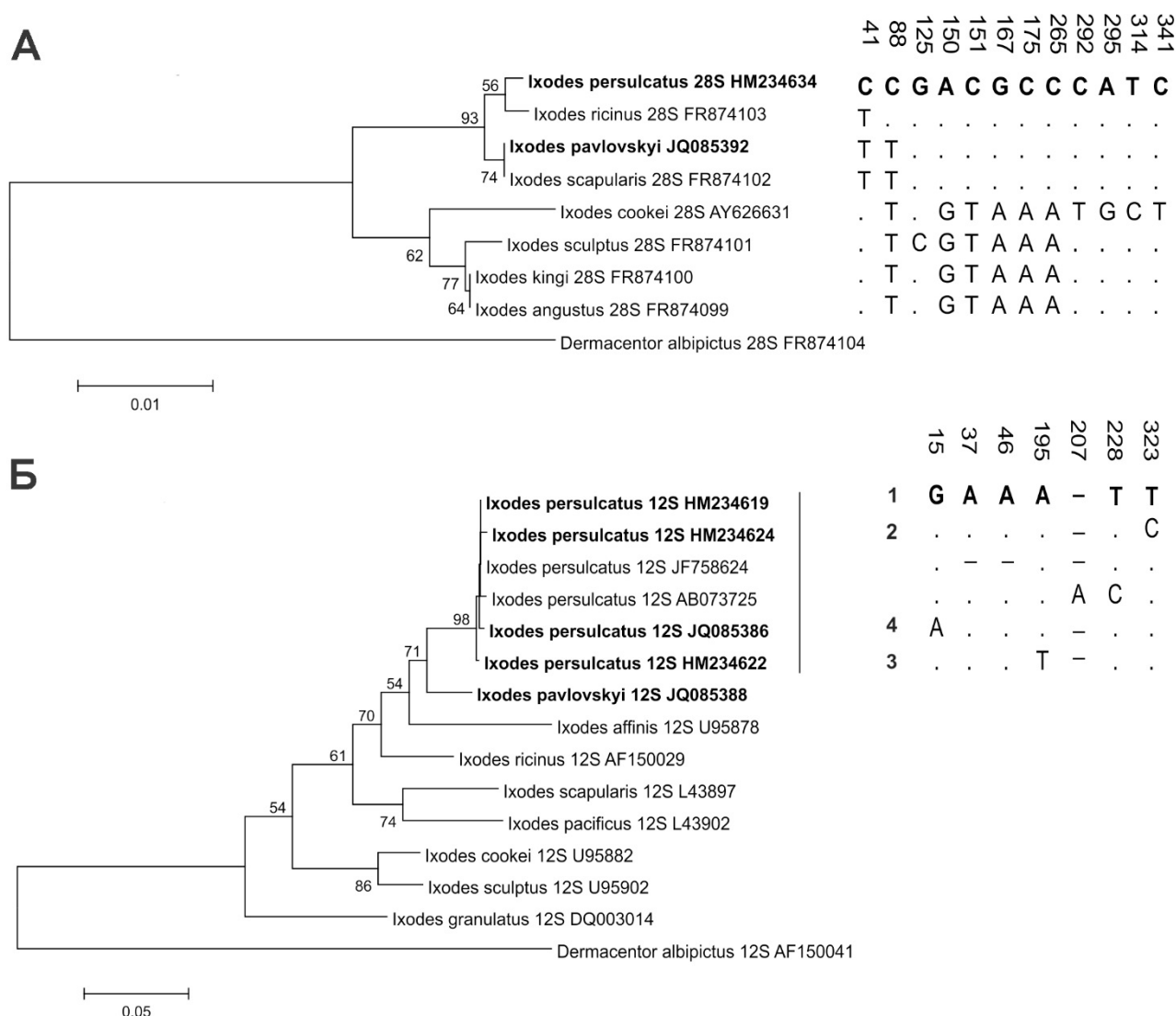


Рис. 3.14. Филогенетическая дендрограмма, показывающая положение *I. persulcatus* среди видов комплекса *I. ricinus* (*Dermacentor albipictus* взят в качестве внешней группы). **А.** Дендрограмма, построенная на основе сегмента D3 28 рНК, содержит полученную в настоящей работе последовательность. **Б.** Дендрограмма, построенная на основе 12S рНК. Показаны вариабельные позиции, характерные для каждого гаплотипа *I. persulcatus*.

Доля вариабельных нуклеотидов по исследуемому участку гена 12S рНК составила 1,14%. В результате анализа данного маркера нами были выделены 4 гаплотипа, среди которых один встречается на всем изученном ареале от Европейской части России до Сахалина в 95% случаев. Два гаплотипа были обнаружены в окрестностях г. Тавда (Западная Сибирь) в



единственном экземпляре и имеют по одной нуклеотидной замене по сравнению с доминирующим гаплотипом. Четвертый гаплотип, имеющий 2 мутации (замена и вставка), выявлен в результате анализа полного митохондриального генома *I. persulcatus* из Японии (AB073725).

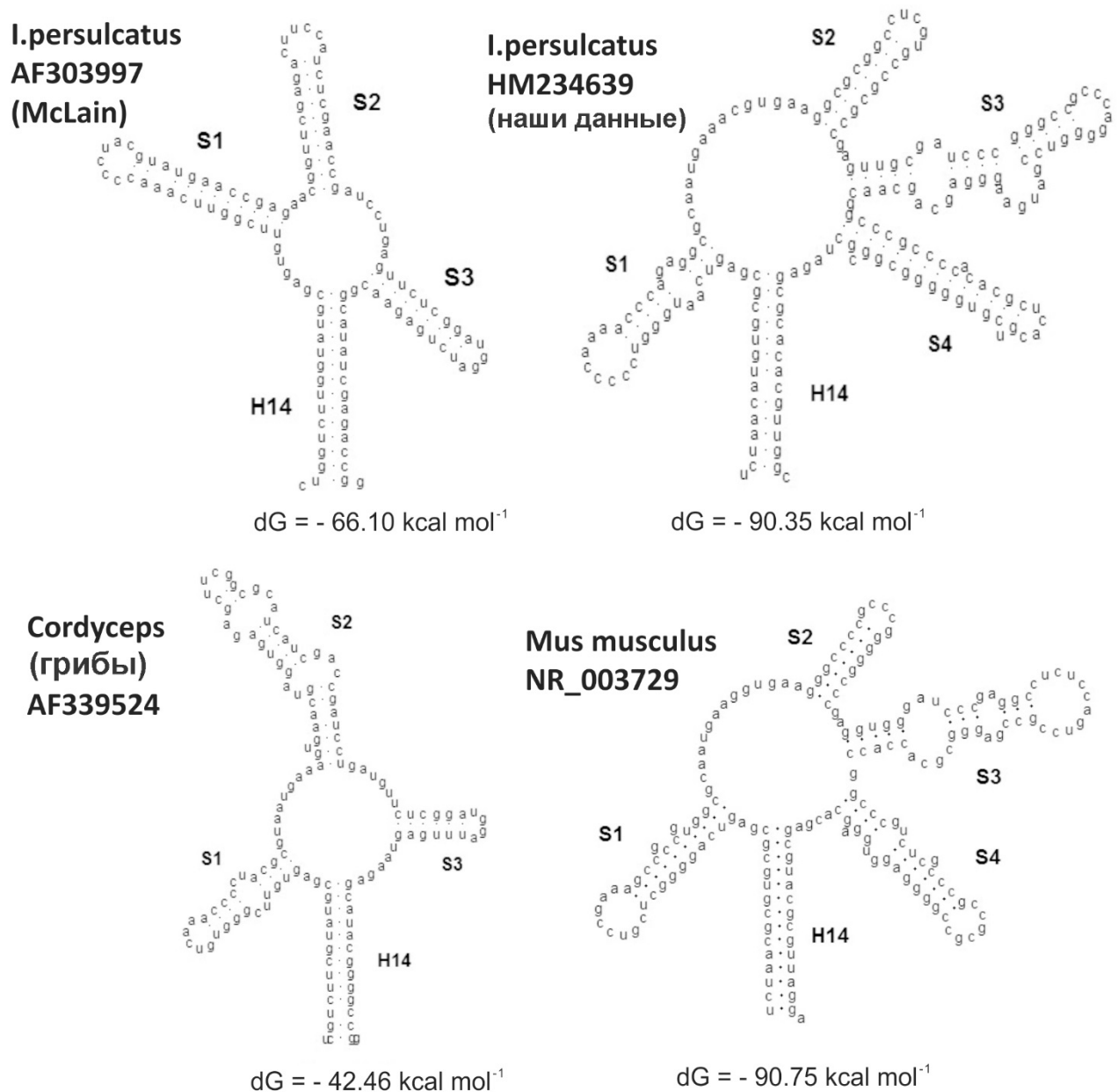


Рис. 3.15. Модели вторичной структуры варибельного сегмента D3 28S рРНК. Показаны модели *I. persulcatus* (согласно McLain D.K. и данным, полученным в настоящей работе), гриба *Cordyceps scarabaeicola*, мыши *Mus musculus*.

Сравнение филогенетических деревьев, построенных по фрагментам 28S и 12S рРНК (Рис. 3.14), позволяет выявить ряд несоответствий в положении видов относительно друг друга (особенно неоднозначное положение *I. ricinus*). Подобные сложности в интерпретации данных по филогении клещей комплекса *I. ricinus* также обсуждаются в литературе [136]. Следует отметить, что уточнение таксономического статуса *I. persulcatus* не являлось целью данной работы и требует привлечения большего количества данных как для *I. persulcatus*, так и для других видов. Существенным же является то, что построенная по 12S рРНК дендрограмма демонстрирует высокую степень гомологии внутри комплекса *I. ricinus* и несомненную принадлежность к нему *I. persulcatus*.

#### *Внутривидовая вариабельность*

Огромный ареал клещей *I. persulcatus* от Прибалтики до Дальнего Востока в совокупности с низкой подвижностью особей позволяет предположить наличие сильной изоляции популяций, проявляющейся на генетическом уровне. Однако, наши исследования показали, что генетические маркеры, применяемые для изучения гетерогенности популяций других видов рода *Ixodes*, не обладают достаточным разрешением для проведения подобных исследований популяций *I. persulcatus*. Так, используя показатель доли вариабельных нуклеотидов, можно сравнить уровни внутривидовой изменчивости филогенетически близких видов. Клещи *I. ricinus*, распространенные в Западной Европе и имеющие перекрывающийся ареал с *I. persulcatus*, хорошо изучены с этой точки зрения и отличаются небольшой степенью гетерогенности по нескольким маркерам [101, 117, 119]. Тем не менее, количество вариабельных сайтов в составе участка 12S рРНК *I. ricinus* на территории Европы составило 2,5% [101]; *I. pacificus* (западное побережье США) – 12,6% [244]; среди популяций *I. scapularis* (восточное побережье США) при том же уровне вариабельности выделяются две хорошо обособленные

линии: северная и южная; данное разделение подтверждается несколькими генетическими маркерами [252].

Таким образом, мы наблюдаем крайне низкую внутривидовую вариабельность (более чем в два раза меньшую по сравнению с *I. ricinus* по 12S рРНК), а также отсутствие выраженной филогеографической структуры популяций *I. persulcatus* в России на уровне изучаемых маркеров. Скорее всего, мутации в 12S рРНК, приведшие к формированию 4 гаплотипов, имеют случайный характер и не позволяют провести какого-либо структурирования популяций. Дальнейшие исследования с применением более вариабельных маркеров, вероятно, смогут подтвердить либо опровергнуть данное предположение.

Наши выводы косвенно подтверждаются данными по вариабельности внутреннего транскрибируемого спейсера 2 (ITS2), свидетельствующими о низком уровне изменчивости ITS2 внутри популяции *I. persulcatus* на территории Японии [139]. При этом имеющиеся данные говорят о более высокой скорости эволюции некодирующих ITS по сравнению с вариабельными сегментами 28S рРНК, которые обычно не обнаруживают внутривидовой изменчивости [85]. Следует отметить, что клещи комплекса *I. ricinus* в целом характеризуются очень высоким показателем идентичности последовательностей ITS2 – около 73%, что свидетельствует о филогенетическом единстве данной группы.

Вероятно, объяснение гомогенности на всем ареале связано не с эволюционной молодостью вида, а с влиянием глобальных климатических изменений прошлого, в частности, последнего плейстоценового оледенения (закончилось приблизительно 10 тыс. лет назад). При наступлении неблагоприятных климатических изменений многие виды вынуждены были отступить в горы, где сохранились подходящие для жизни условия – таким образом сформировались рефугиумы [170]. Предположительно, некая популяция *I. persulcatus* сформировала единственный рефугиум, скорее всего,

на юге Сибири или на Дальнем Востоке, откуда затем расселилась по всей таежной зоне Евразии. В таком случае более высокая изменчивость *I. ricinus* (2,5 % по 12S рРНК [101]) может быть следствием его расселения либо из нескольких рефугиумов, находящихся на территории Западной Европы [169], либо из одного, но объединившего в себе несколько исходных популяций.

*«Глубокая» генетическая структура I. persulcatus*

Наши исследования 28S рРНК *I. persulcatus*, являясь воспроизведением работы McLain D.K. [227], привели к противоположным результатам и опровержению его выводов. Так, McLain D.K. указывает на то, что популяции *I. persulcatus* отличаются друг от друга в той же степени, как разные виды *Ixodes* между собой. Кроме того, последовательности *I. persulcatus* содержат делеции (в общем 60 нуклеотидов) и в значительной степени отличаются от последовательностей других клещей. Согласно McLain D.K., идентичность последовательностей D3 сегмента видов комплекса *I. ricinus* без включения *I. persulcatus* составила 60%, в то время как его добавление уменьшает данный показатель до 12% [227]. Построенное нами выравнивание показывает, что наша последовательность 28S рРНК *I. persulcatus* входит в одну группу с остальными видами *Ixodes*, тогда как последовательности *I. persulcatus* McLain D.K. формируют совершенно особый кластер (Рис. 3.16).

Несмотря на отсутствие морфологических и генетических данных, подтверждающих столь сильную межпопуляционную вариабельность, статья McLain D.K. привела к формированию ошибочного представления об эволюции *I. persulcatus*. Более того, факт значительной изменчивости D3 сегмента на внутривидовом уровне вошел в ряд обзоров, посвященных методам изучения генетической структуры и филогеографии клещей [114, 241].

<i>I. persulcatus</i>	HM234638	TCTAACAT-G	TGCGCG--AG	TCAATGGGTC	CCC-CAAAAC	CCAGAGGC-G	CAATGAAACG
<i>I. cookei</i>	AY626631	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>I. affinis</i>	AF303991	.....	GA..	.....	AGT-.....	.....	T.....
<i>I. ricinus</i>	AF303988	.....	.....	.....	.T-.....	.....	.....
<i>I. scapularis</i>	AF303986	.....G.-	.....	.....	.T-..G...	.....	.....
<i>I. scapularis</i>	AF303987	.....	.....	.....	.T-..T..	T.....	.....
<i>I. pacificus</i>	AF303989	.....	.....	.....	.T.T.....	.....	.....
<i>I. woodi</i>	AF303990	.....G.-	.....	.....	.....	.....	.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303992	-TCGT.T.C.	.AT...AGT.	--TTC....G	T.A-----	..CT.C.-.	T.....-A.
<i>I. persulcatus</i>	AF303993	-TCGT.T.C.	.AT...AGT.	--TTC....G	T.A-----	..CT.C.-.	T.....-A.
<i>I. persulcatus</i>	AF303994	-TCGT.T.C.	.AT...AGT.	--TTC....G	T.A-----	..CT.C.-.	T.....-A.
<i>I. persulcatus</i>	AF303995	..GG-.T.C.	.AT...AGC.	ATT.C....G	ATT-----	----.CC.-.	T...TG--G.
<i>I. persulcatus</i>	AF303996	..GGT.T.C.	.AT...AGC.	-TT.C....G	ATT-----	----.CC.-.	T...TG--G.
<i>I. persulcatus</i>	AF303997	..GGT.T.G.	.AT...AGT.	--TTC..T.-	..A-----	..CT.C.T-A	TG.AC----
<i>I. persulcatus</i>	AF303998	..GG..TCG.	.AT...AGTT	-----G	T.A-----	.....	T.....T-..
<i>I. persulcatus</i>	AF303999	..GG..TCG.	.AT...AGTT	-----G	T.A-----	.....	T.....C-..
<i>Cordyceps</i>	AF339524	GTCGT.T.C.	.AT...AGT.	--TTC....G	T.A-----	..CT.C.-.	T.....-A.
<i>I. persulcatus</i>	HM234638	TGAAGGC---	---GCGGCCT	CGTGCCGCG-	--CCGAGTTG	CGATCCCGGG	---CCGCCCA
<i>I. cookei</i>	AY626631	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>I. affinis</i>	AF303991	.....	.....	T-----	--AGCT....	.....T....	ACT.....T.
<i>I. ricinus</i>	AF303988	.....	.....	T-----	..GAC.....	.....	ACT.....
<i>I. scapularis</i>	AF303986	.....	.....	T-C.TGA.-	---GCT....	.....	ACT.....
<i>I. scapularis</i>	AF303987	CC.....	---A....G	T.CCTT.-	---GC.....	.....A....	ACT.....
<i>I. pacificus</i>	AF303989	.....AGC	TCA..T....	T-C.TGA.-	---GCT....	TT.....	AC-T..T...
<i>I. woodi</i>	AF303990	.....	.....	T-C.TGA.-	---T-.....	.....	ACT.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303992	...C.TAGG	TGA.A..T..	..GCGAT.A-	TCATCGA--C	.....T.AT	-GTT.T.GG.
<i>I. persulcatus</i>	AF303993	...C.TAGG	TGA.A..T..	..GCGAT.A-	TCATCGA--C	.....T.AT	-GTT.T.GG.
<i>I. persulcatus</i>	AF303994	...C.TAGG	TGA.A..T..	..GCGAT.A-	TCA.CGA--C	.....T.AT	-GTT.T.GG.
<i>I. persulcatus</i>	AF303995	...C.TAGG	AGA.AAA.T.	..GTGA.G.C	TCAGCGAAGT	T.G...T.AT	AGTT.T.GG.
<i>I. persulcatus</i>	AF303996	...C.TAGG	AGA.A.-.T.	..GCGAT.A-	TCA.CGAAGC	T...T.AT	ATTG.T.GG.
<i>I. persulcatus</i>	AF303997	A...C--GG	TTC.A.A.T.	.CAT.-----	---TCGAA-C	.....T.A-	-GTT.T.GG.
<i>I. persulcatus</i>	AF303998	...C.TTCG	GTTTCA..	TCGCGAT.A-	TCTGTGA--C	.....A.T.AT	-GTT.T.GG.
<i>I. persulcatus</i>	AF303999	...C.TTCG	GTTTCA..	TCGCGAT.A-	TCTGTGA--C	.....A.T.AT	-GTT.T.GG.
<i>Cordyceps</i>	AF339524	...C.TAGG	TGA.A.-.T.	..GCG--.A-	TCATCGA--C	.....T.AT	-GTT.T.GG.
<i>I. persulcatus</i>	HM234638	GGGGTCCGAT	GAAGGGAGCA	GCAACGG---	CCCCCCCC-A	CA-C--GCTC	ACGTCGTGG-
<i>I. cookei</i>	AY626631	.....	.....	.....	.....G	T.-.....	.....A.-
<i>I. affinis</i>	AF303991	.....	..G.A.C.-	.....CT-	.GT...TAA.	T.G.TA...	.T..T...A
<i>I. ricinus</i>	AF303988	.....	.....	.....	.....	---CA....	.....A
<i>I. scapularis</i>	AF303986	.....	.....	.....	.....	---TA....	.....T
<i>I. scapularis</i>	AF303987	.....T..	.C.....	.....	.....	---TA....	.....G
<i>I. pacificus</i>	AF303989	.....	.....	.....CGA	.T.....	..G.TA....	.....A
<i>I. woodi</i>	AF303990	.....	.....	.....	.....G	AG-..TA....	.....A
<i>I. persulcatus</i>	AF303992	T..A.T-TGA	T.A-.....	TACGG.....	..G-----	.....	.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303993	T..A.T-TGA	T.A-.....	TACGG.....	..G-----	.....	.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303994	T..A.T-TGA	T.A-.....	TACGG.....	..G-----	.....	.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303995	TC.A...T-A	T.AT.T...	TATGG.....	..G-----	.....	.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303996	TC.A...TGA	T.AT.T...	TATGG.....	..G-----	.....	.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303997	T..A.-TGA	..C--G...	TATCGA.A--	..G-----	.....	.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303998	T..A.-A	T.T--C...	TATTG..T--	..G-----	.....	.....
<i>I. persulcatus</i>	AF303999	T..A.-T.A	T.T--C...	TATTG..T--	..G-----	.....	.....
<i>Cordyceps</i>	AF339524	T..A.T-TGA	T.A-.....	TACGG.....	..G.A...G.	A.GAAG.TGA	..TAT.CCTG
<i>I. persulcatus</i>	HM234638	--GGGCG---	--GCGCTAGA	GCGCACACGT	TGGC		
<i>I. cookei</i>	AY626631	-----	---A.....	.....	.....		
<i>I. affinis</i>	AF303991	---AATATGA	GCTA..CGCT	-----	T.....	..A	
<i>I. ricinus</i>	AF303988	GAC.A..T--	---A.....	-----	.....	..A	
<i>I. scapularis</i>	AF303986	GAC.A..TGA	GCTA.....	-----	.....	..A	
<i>I. scapularis</i>	AF303987	T-C.A..TGA	GCTA.....	-----	.....	..A	
<i>I. pacificus</i>	AF303989	--C.A..TGA	GCTA..CT.	..A.....	.....	..A	
<i>I. woodi</i>	AF303990	-----AC-	GT.A.....	-----	.....	..A	
<i>I. persulcatus</i>	AF303992	-----	-----	-----	-----		
<i>I. persulcatus</i>	AF303993	-----	-----	-----	-----		
<i>I. persulcatus</i>	AF303994	-----	-----	-----	-----		
<i>I. persulcatus</i>	AF303995	-----	-----	-----	-----		
<i>I. persulcatus</i>	AF303996	-----	-----	-----	-----		
<i>I. persulcatus</i>	AF303997	-----	-----	-----	-----		
<i>I. persulcatus</i>	AF303998	-----	-----	-----	-----		
<i>I. persulcatus</i>	AF303999	-----	-----	-----	-----		
<i>Cordyceps</i>	AF339524	TATA.G.TGA	AGC.AGAG..	AACTCTGGTG	GA.G		

Рис. 3.16. Выравнивание последовательностей фрагмента D3 клещей комплекса *I. ricinus*. Приведены последовательности из работы McLain D.K., 2001 и полученная в нашем исследовании (HM234638). Точками показаны нуклеотиды, совпадающие с первой последовательностью. Цветом выделены последовательности *I. persulcatus*, полученные McLain D.K. Для сравнения показана последовательность D3 гриба *Cordyceps scarabaeicola*.

Мы попытались установить причину столь сильных расхождений с нашими данными. Результаты McLain D.K. можно объяснить универсальностью используемых им праймеров в совокупности с недостаточным анализом полученных данных. Так, праймеры, разработанные им на основе полной последовательности 28S рРНК *Drosophila melanogaster*, являются крайне консервативными и могут амплифицировать фрагменты 28S рРНК широкого круга эукариот (паразиты, сапрофиты, симбионты, а также прокормители клещей). В литературе имеются упоминания о проблемах, возникающих при работе с высококонсервативными праймерами при наличии более чем одной матрицы в образце [99, 242, 300]. Факт отсутствия в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей D3 сегмента 28S рРНК клещей (на момент проведения работы McLain D.K.) мог способствовать ошибочному определению видовой принадлежности полученных фрагментов. С помощью программы BLAST нами было установлено, что две последовательности сегмента D3 *I. persulcatus*, полученные McLain D.K. (AF303992, AF303993), обладают полной гомологией с последовательностями таких энтомопатогенных грибов, как *Beauveria* spp. (например, *B. caledonica* AF339520) и *Cordyceps* spp. (*C. scarabaeicola* AF339524) (за исключением трех делеций). Наличие грибов в клещах легко объясняется особенностями их экологии и необходимостью постоянного контакта с почвой и растительностью. Находящиеся здесь почвенные и энтомопатогенные грибы могут колонизировать поверхности клеща (или яиц) при его жизни. Так, ДНК грибов неоднократно выделялась из суспензий клещей [279]. Кроме того, в образцах двух видов *Ixodes* (*I. kingi* и *I. sculptus*) были обнаружены грибы, ДНК которых амплифицировалась с праймерами, разработанными McLain D.K. [82].

В случае амплификации фрагментов рРНК важной особенностью матрицы является достаточно стабильная вторичная структура. Было показано, что при наличии естественной контаминации образцов (грибами, водорослями) возможна преимущественная амплификация той или иной матрицы в зависимости от условий ПЦР [99].

Нами было показано, что применение методики «горячего старта» (путем разделения компонентов реакционной смеси парафином) значительно влияет на выход ПЦР-продукта (Рис. 3.17). Так как разница в длине фрагментов ДЗ между животными и грибами составляет приблизительно 50-60 нуклеотидов, преимущественную амплификацию легко наблюдать по изменению длин фрагментов в агарозном геле после электрофоретического разделения. При проведении ПЦР с «горячим стартом» у двух выбранных проб (А и В) нами не было получено целевых фрагментов длиной 387 н.п. (Рис. 3.17). Амплифицированные фрагменты были секвенированы и идентифицированы. Так, наиболее короткий фрагмент длиной 205 н.п. (Рис. 3.17, 1) представляет собой делетированную последовательность 28S рРНК *I. persulcatus*, вероятно, образовавшуюся в ходе ПЦР (феномен «прыгающей» ПЦР [247]) в связи со сложностью преодоления полимеразой стабильной вторичной структуры рРНК. Фрагменты длиной примерно 340 н.п. (Рис. 3.17, 2) соответствуют рРНК грибов. С помощью алгоритма BLAST была установлена 100% идентичность нашей последовательности с грибом *Cladosporium sphaerospermum* (GU017542). Кроме того, была обнаружена последовательность, длина которой больше длины целевой на 10 нуклеотидов (Рис. 3.17, 3). Возможно, она принадлежит какому-то виду беспозвоночных, последовательностей которого нет в базе данных. Без применения «горячего старта» равновесие смещается в сторону амплификации целевой матрицы – рРНК *I. persulcatus* (Рис. 3.17, 4). Таким

образом, при определенных условиях ПЦР можно получить фрагменты широкого круга организмов, но не получить искомого продукта, что, вероятно, и произошло в работе McLain D.K. в случае *I. persulcatus*.

Вторичная структура D3 сегмента, анализу которой посвящена вторая статья McLain D.K. [226], только подтверждает данное предположение. Многие авторы указывают на высокую консервативность вторичной структуры рРНК, в том числе и вариабельных участков [161, 230]; в то время как, согласно McLain D.K., D3 сегмент *I. persulcatus* отличается от других видов даже по числу стеблей (три по сравнению с четырьмя у других видов). Так, приводимая McLain D.K. вторичная структура сегмента D3 *I. persulcatus* ближе к грибам, чем другим клещам и даже млекопитающим (*Mus musculus*, Рис. 3.15).

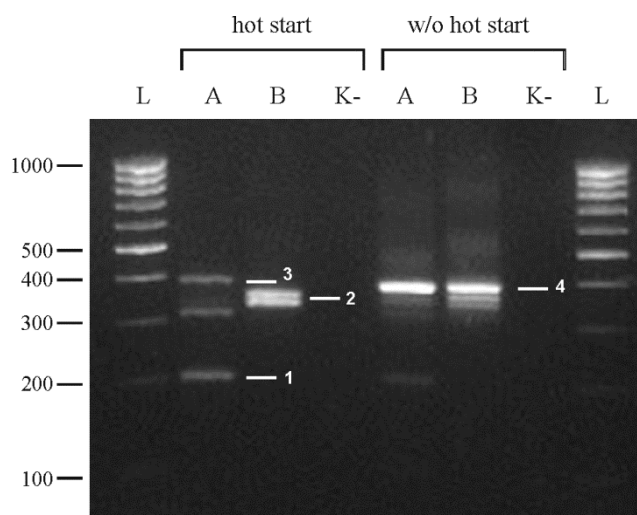


Рис. 3.17. Демонстрация влияния «горячего старта» на выход ПЦР - продукта (описание в тексте).

Исходя из всего вышеизложенного, приходится признать, что выводы McLain об обособленности и значительной межпопуляционной изменчивости клещей *I. persulcatus* основываются на анализе чужеродных последовательностей разных видов (скорее всего, грибов), вследствие чего являются ошибочными. Приведенным примером хотелось бы предостеречь



исследователей от поспешных выводов, особенно при резком расхождении собственных результатов с данными других работ.

Данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что клещи *I. persulcatus* не представляют из себя обособленной и гетерогенной группы, а являются неотъемлемой частью единого комплекса *I. ricinus*, как было продемонстрировано при изучении других маркеров [139, 298]. Таким образом, было показано, что консервативные маркеры (гены рРНК) непригодны для выявления генетически различных популяций клещей и изучения процессов формирования их коэволюционных связей с ВКЭ, для чего должны быть использованы более переменные участки генома.

## **ГЛАВА 4. ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА И ЭВОЛЮЦИЯ ВКЭ**

### **4.1. Кластеронная структура популяций ВКЭ**

Несмотря на успехи в изучении генетического разнообразия нуклеотидных последовательностей, следует признать, что вирусологи затрудняются дать ответ на ряд ключевых вопросов, касающихся как особенностей формирования очагов КЭ, так и эволюции ВКЭ. Одной из причин этого является отсутствие эффективной классификации ВКЭ в пределах субтипа.

Любые классификации представляют собой группирование объектов с целью систематизации материала для простоты его восприятия и эффективности дальнейших исследований. Поиск надежных дискриминирующих признаков, обеспечивающих сравнимость и воспроизводимость молекулярных данных, привел нас к разработке нового подхода в дифференциации популяций ВКЭ. Хотя максимальной информативностью для филогенетических и филогеографических исследований, бесспорно, обладают полногеномные последовательности (особенно когда их количество исчисляется сотнями и даже тысячами, как, например, у вируса лихорадка Западного Нила (612 последовательностей) или вируса лихорадки Денге (3162), к настоящему времени известна лишь 141 полногеномная последовательность ВКЭ, что явно недостаточно для изучения структуры популяций и решения вопросов его происхождения и механизмов распространения. Выходом из этой ситуации может стать привлечение последовательностей отдельных генов или их фрагментов [147, 202, 284]. Дополнительным преимуществом использования фрагментов генома является возможность проведения прямого секвенирования без предварительного пассирования вируса в культуре клеток или в лабораторных животных, а, следовательно, и оперативного

мониторинга неблагополучных по КЭ территорий. С точки зрения изучения эволюции вируса именно «клещевые» последовательности его генома представляют наибольший интерес. Так как известно, что ВКЭ способен сравнительно быстро, за 4-8 пассажей, изменять свои генетические и фенотипические свойства при адаптации к модельным системам – культурам клеток или лабораторным животным [222, 262], прямая амплификация и секвенирование вирусной кДНК позволяет идентифицировать вирус и проанализировать его генетические свойства без этапа культивирования, что сводит к минимуму вероятность появления несвойственных природному вирусу как адаптивных, так и вызванных ошибками РНК-полимеразы изменений генома.

Наибольшее количество последовательностей ВКЭ, зарегистрированных в GenBank, приходится на ген Е – 235 полноразмерных последовательностей и около 1104 последовательностей его фрагмента (с учетом полногеномных и гена Е последовательностей) длиной 454 н.п.

Недавно нами была показана принципиальная возможность дифференциации популяций ВКЭ-Сиб на отдельные группы штаммов (кластеры) по признаку идентичности аминокислотных последовательностей фрагмента белка Е (разд. 3.2). Данный подход оказался весьма продуктивным и позволил обосновать гипотезу антропогенной диссеминации природных очагов клещевого энцефалита на территории Сибири, Урала и Восточной Европы.

В продолжение этой работы нами был разработан кластерный подход как основа для дифференциации популяций ВКЭ и создания классификации штаммов в пределах субтипа. Также было дано

обоснование целесообразности использования данного подхода для регистрации, учета и мониторинга популяций ВКЭ.

### *Свойства кластеронов*

Филогенетический анализ 282 исследованных штаммов ВКЭ, выделенных на территории Среднего Урала, показал, что все они принадлежали сибирскому субтипу. Проведенное сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента гена Е исследованных штаммов, а также последовательностей штаммов ВКЭ-Сиб из GenBank (всего 617 штаммов) позволило выделить 18 групп штаммов с одинаковой аминокислотной последовательностью. Для этих групп, ранее обозначенных как «кластеры», ввиду многозначности данного термина было предложено новое обозначение – «кластероны». Название кластерона состоит из цифрового и буквенного обозначения: цифра обозначает субтип (1 – ВКЭ-Дв, 2 – ВКЭ-Ев и 3 – ВКЭ-Сиб), а буква соответствует определенной аминокислотной последовательности. Количество штаммов, входящих в кластероны, варьировало от 3 (0,5%) до 285 (46,2%) (табл. 4.1). Кластероны существенно отличались по количеству синонимических замен ( $d_s$ ) между штаммами внутри кластерона: от 1 до 135 нуклеотидных замен на изученном фрагменте гена Е. Однако, показатель  $d_s$  не связан прямой зависимостью с численностью штаммов в кластере (табл. 4.1). Аминокислотный профиль каждого кластерона не является случайным, поскольку закреплен у большого количества штаммов, эволюционно и географически связанных между собой. Так, было показано, что кластерон-специфичные аминокислотные замены расположены только на одной латеральной поверхности гликопротеина Е (рис. 4.1), что свидетельствует об их определенной функциональной роли. Изучение влияния каждой из тринадцати

аминокислотной замен или их комбинаций на структуру и свойства белка Е у ВКЭ-Сиб является отдельным вопросом, требующим проведения дальнейших исследований.

Одиночные штаммы, а также группы штаммов с количеством не более двух были отнесены группе *уникальных*, в которую вошли 117 (19,0%) штаммов. Из 151 аминокислоты фрагмента белка Е переменными были 70, однако кластероны были сформированы только 13 аминокислотными заменами (табл. 4.1).

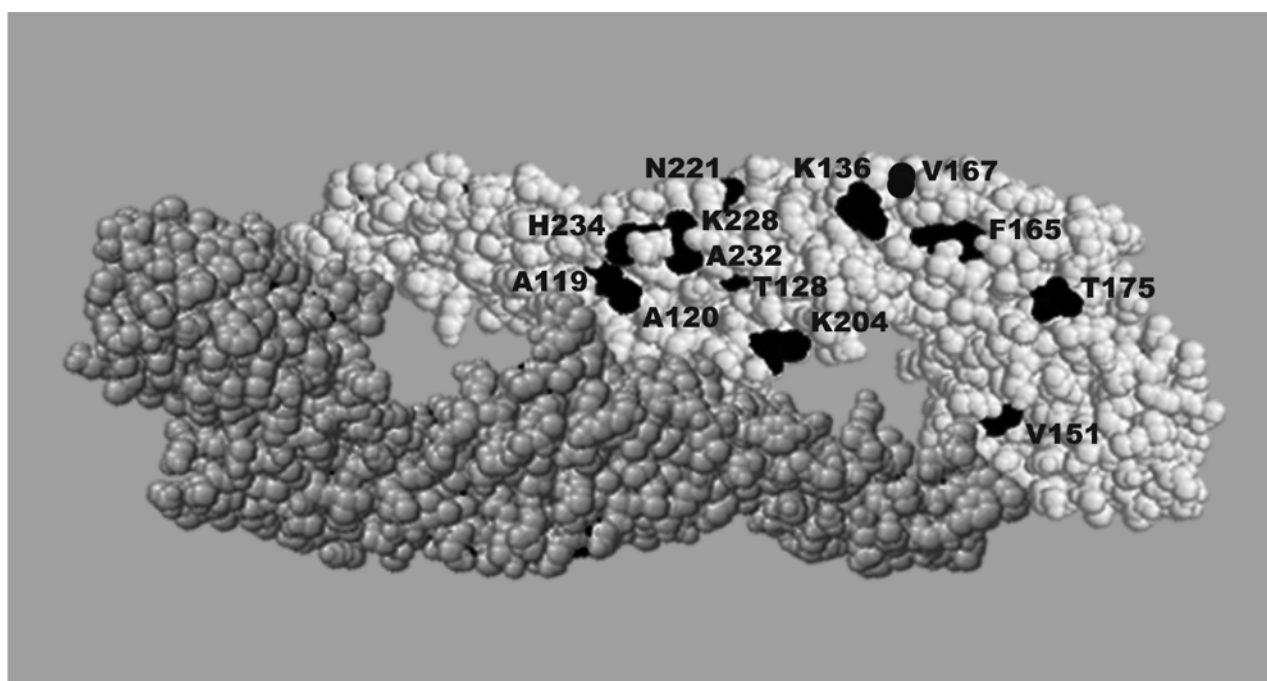


Рис. 4.1. Трехмерная модель поверхности гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита (штамм *Zausaev*). Две субъединицы димера окрашены в белый и серый цвет соответственно. Кластерон-специфичные аминокислоты выделены черным цветом.

#### *Кластеронная структура*

Таким образом, популяции ВКЭ-Сиб могут быть представлены в виде кластеронов, которые отличаются количественным и качественным составом, т.е. могут быть охарактеризованы посредством кластеронной структуры.

Таблица 4.1

**Характеристика кластеронов ВКЭ-Сиб и кластерон-специфичные  
аминокислотные замены фрагмента гликопротеина Е**

Кластерон	Прототипный штамм	GenBank № доступ.	Кол-во штаммов, %	d <sub>S</sub> *	119	120	128	136	151	165	167	175	204	221	228	232	234
<b>3A</b>	Zausaev	AF527415	285 (46.2)	<b>135**</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>H</b>
<b>3B</b>	Ekb125-2007	GU444253	35 (5.8)	6	.	.	.	.	.	.	.	<b>N</b>	.	.	.	<b>G</b>	<b>Q</b>
<b>3C</b>	Z6	EF566817	16 (2.6)	33	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>R</b>	.	.	.	.
<b>3D</b>	Est54	DQ393773	50 (8.1)	<b>68</b>	.	.	.	.	.	.	.	<b>N</b>	.	.	.	.	.
<b>3E</b>	Ekb361-2008	GU444279	5 (0.8)	14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>V</b>	.
<b>3F</b>	Ekb91-2007	GU444225	39 (6.3)	48	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>R</b>	.	.
<b>3G</b>	Kokkola-102	DQ451295	9 (1.5)	12	<b>V</b>	.	.	.	.	.	.	<b>N</b>	.	.	.	.	.
<b>3H</b>	Aina	AF091006	13 (2.1)	33	<b>V</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>Q</b>
<b>3I</b>	Ekb669-2006	GU444204	11 (1.9)	3	.	.	.	.	<b>I</b>	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>3J</b>	IR99-1m1	AB049348	3 (0.5)	20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>Q</b>
<b>3K</b>	1130	EU443275	4 (0.6)	18	.	.	.	<b>R</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>3L</b>	1699	EU443268	4 (0.6)	34	.	.	<b>I</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>3M</b>	24	GU143822	3 (0.5)	16	.	.	.	.	.	.	<b>I</b>	.	.	.	.	.	.
<b>3N</b>	IR99-lm4	AB049349	3 (0.5)	19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>S</b>	.	.	.
<b>3O</b>	Ekb90-1-2007	GU444224	3 (0.5)	1	.	.	.	.	.	.	.	<b>N</b>	<b>R</b>	.	.	.	.
<b>3P</b>	Vologda-4-06	FJ214139	8 (1.3)	15	.	.	.	.	.	.	.	<b>N</b>	.	.	.	.	<b>Y</b>
<b>3Q</b>	Ekb752-2005	JX315727	5 (0.8)	3	.	.	.	.	.	<b>S</b>	.	<b>N</b>	.	.	.	<b>G</b>	<b>Q</b>
<b>3U</b>	886-84	EF469662	4 (0.6)	6	.	<b>S</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>N</b>
<b>3Unique</b>			117 (19.0)														
<b>Total</b>			617 (100)														

\* – количество синонимических замен в фрагменте гена Е;

\*\* - только штаммы Азиатской филогенетической линии.

Несмотря на то, что количество нуклеотидных последовательностей фрагмента гена Е штаммов ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев, размещенных в GenBank, существенно меньше, чем ВКЭ-Сиб, кластеронная структура была показана также и для них (Приложение VI и VI). Позиции кластерон-специфичных аминокислотных замен для каждого субтипа, как правило, отличаются друг от друга (табл. 4.1, Приложение VII). Особенности кластеронной структуры для трех субтипов ВКЭ приведены в табл. 4.2.

На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей все кластероны ВКЭ-Сиб можно объединить в четыре монофилетические группы.

Таблица 4.2

## Сравнение характеристик кластеронов субтипов ВКЭ

Субтип ВКЭ	Кол-во кластеронов	Минимальное кол-во штаммов в кластере	Вариабельные позиции в кластерах	Кол-во всех вариабельных позиций, (%)	Кол-во штаммов	Кол-во штаммов в кластерах, (%)	Кол-во уникальных штаммов (%)
<b>ВКЭ-Сиб</b>	18	3	13	70 (46.4)	617	500 (81.0)	117 (19.0)
<b>ВКЭ-Ев</b>	10	2*	9	28 (18.5)	191	166 (86.9)	25 (13.1)
<b>ВКЭ-Дв</b>	11	2*	10	31 (20.5)	101	77 (76.2)	24 (23.8)
<b>Всего</b>	<b>39</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>909</b>	<b>743 (81.7)</b>	<b>166 (18.3)</b>

\* - для того чтобы соразмерно представить кластеронную структуру ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев, минимальное количество штаммов в кластере уменьшено по сравнению с ВКЭ-Сиб до двух.

Кластероны ВКЭ-Сиб, относящиеся к первой филогенетической группе и составляющие большую часть изученных штаммов (3A, 3C, 3E, 3F, 3I, 3K, 3L, 3M и 3N), распространены в основном в азиатской части ареала (Урал и Западная Сибирь), поэтому эта группа кластеронов была названа *Азиатской* (прототипный штамм *Zausaev*, AF527415). Вторая группа кластеронов (3H и 3J) встречается на юге Западной Сибири и была названа *Южно-сибирской* (штамм *Aina*, AF091006). Третья группа (3B, 3D, 3G, 3O, 3P и 3Q), распространенная на Урале, Северо-западной части России, а также странах Балтии была названа *Восточно-европейской* или *Балтийской* (Est54, DQ393773). Четвертая группа (кластерон U, штамм 886-84) встречается в Бурятии и Северной Монголии и названа *Бурято-монгольской* (886-84, EF469662) (рис. 4.2). Таким образом, все штаммы ВКЭ-Сиб, входящие в кластероны одной филогенетической группы, связаны между собой общим происхождением.

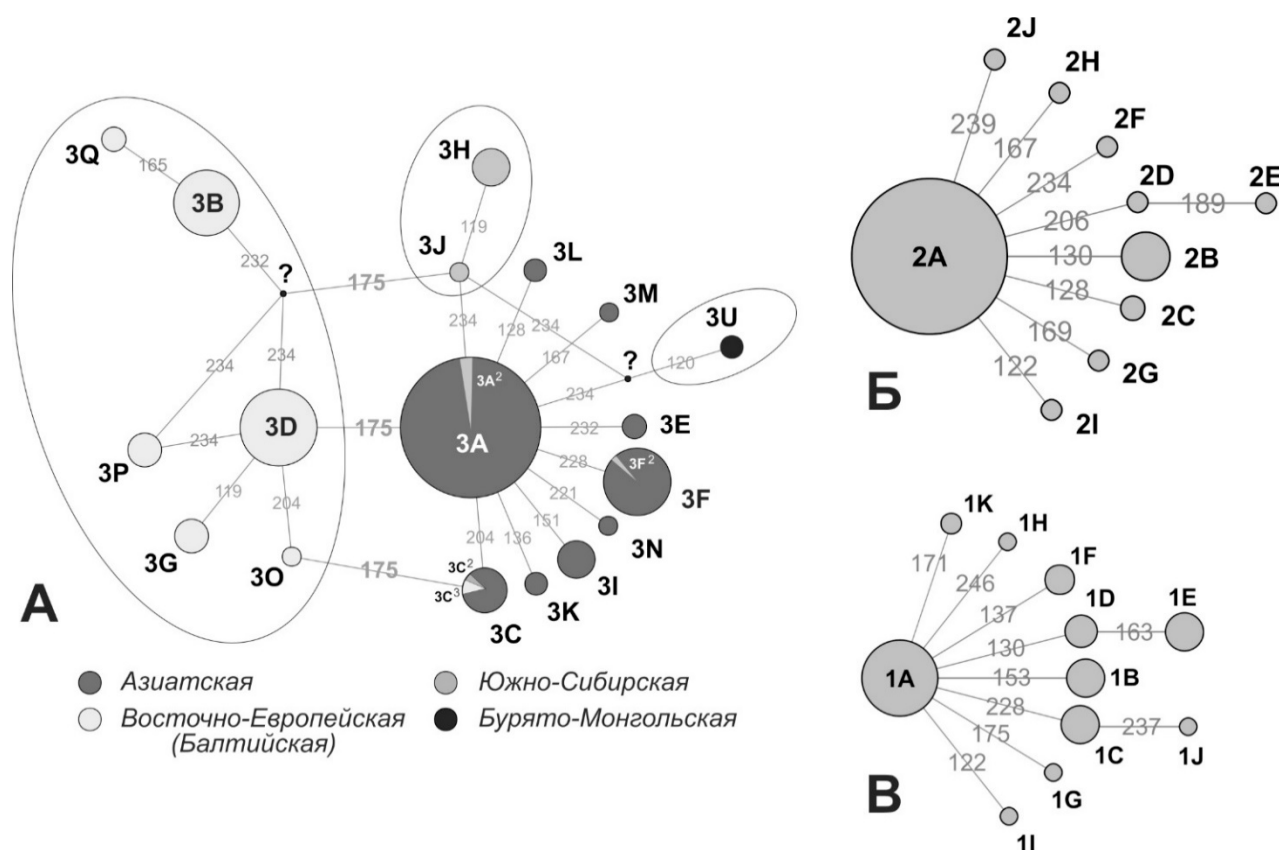


Рис. 4.2. Филогенетические сети, показывающие связи между последовательностями кластеронов: **А.** ВКЭ-Сиб, **Б.** ВКЭ-Ев, **В.** ВКЭ-Дв. Цифра в названии кластерона обозначает субтип ВКЭ (например, 1А, 2А и 3А относятся к ВКЭ-Дв, ВКЭ-Ев и ВКЭ-Сиб соответственно). Цветом и овалами выделены филогенетические группы кластеронов. Площадь кругов пропорциональна количеству штаммов в кластероне. Знаком вопроса обозначены последовательности, соответствующие которым кластероны пока не обнаружены. На линиях, связывающих кластероны, обозначены позиции аминокислотных замен в белке Е.

Однако, существуют и исключения, когда в кластероны могут входить штаммы разных филогенетических групп. Этот феномен был отмечен только для кластеронов первой группы. Так, 15 (5,3%) штаммов кластерона 3А, 1 (6,3%) кластерона 3С и 1 (2,6%) кластерона 3F филогенетически относились ко второй, а 2 (12,5%) штамма кластерона 3С – к третьей группе (рис.4.3). Подобные штаммы были обнаружены только на территории Западной Сибири и Среднего Урала и были названы 3А<sup>2</sup>, 3С<sup>2</sup>,



3F<sup>2</sup> и 3C<sup>3</sup> (рис. 4.2, Приложение VI, Clusters\_TBЕV-Сиб\_update1.kml (<http://dnk-ural.ru/nauchnaya-rabota/kleshchevoj-entsefalit>)).

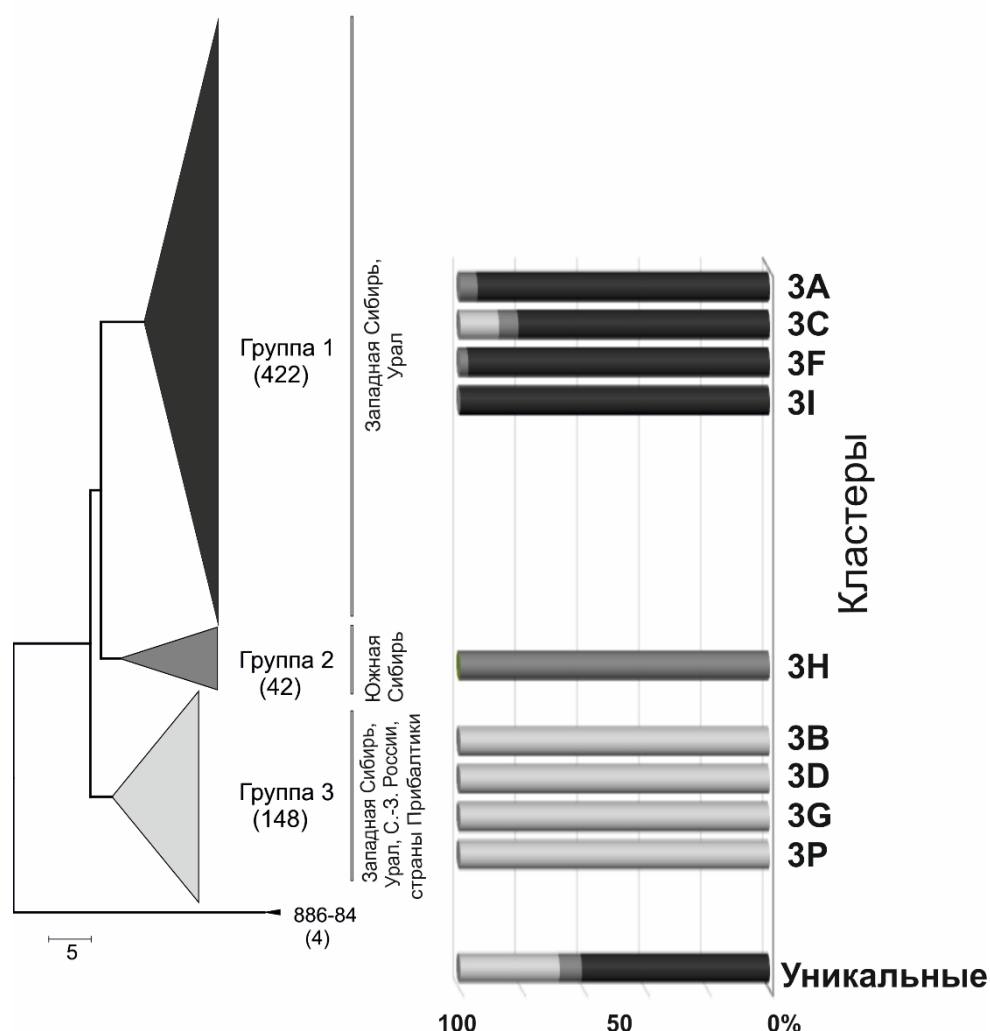


Рис. 4.3. Филогенетические группы ВКЭ-Сиб (слева) и распределение штаммов по основным кластерам (справа). В скобках приведено количество штаммов, входящих в группы. Цветами обозначены штаммы разных филогенетических линий.

Таким образом, *кластерон* – это структурный элемент популяции ВКЭ, состоящий из штаммов, имеющих идентичную аминокислотную последовательность фрагмента гена Е, как правило, связанных филогенетически и имеющих определенный тип территориального распределения. Количественный и качественный состав кластеронов, их

размер, время возникновения и степень дивергенции определяют кластеронную структуру ВКЭ.

Территории, эндемичные по КЭ, являются уникальными как по кластеронному составу, так и по количеству штаммов в кластеронах (рис. 4.4). Территориальное распределение штаммов, входящих в кластероны, соответствует либо коридорному, либо локальному типу (Приложение VI, Clusters\_TBЕV-Сиб\_update1.kml (<http://dnk-ural.ru/nauchnaya-rabota/kleshchevoj-entsefalit>)). Это позволяет проследить происхождение и распространение штаммов ВКЭ, что подтверждается ранее полученными данными (разд. 3.2).



Рис. 4.4. Географическое распределение кластеронов ВКЭ-Сиб в пределах филогенетических групп (показаны разными цветами). Размер букв, обозначающих кластероны, пропорционален количеству входящих в них штаммов.

Связи между аминокислотными последовательностями кластеронов разных субтипов ВКЭ могут быть визуализированы с помощью филогенетической сети (рис. 4.2). Кластеронная структура ВКЭ-Сиб является наиболее сложно организованной и представлена разветвленной сетью кластеронов с разным количеством штаммов в них (рис. 4.2А). Различия между кластеронами ВКЭ-Сиб могут достигать до шести аминокислотных замен. В то же время, кластеронная структура ВКЭ-Ев и ВКЭ-Дв достаточно проста, различия между кластеронами составляют от трех до четырех замен соответственно (рис. 4.2Б и 4.2В). Выраженных филогеографических особенностей распределения кластеронов ВКЭ-Ев и ВКЭ-Дв, в отличие от ВКЭ-Сиб, не выявлено.

Сложная структура ВКЭ-Сиб может быть представлена в виде двух простых, различающихся по маркерной аминокислоте в позиции 175 белка Е (рис. 4.2А), известных как “Балтийская” и “Сибирская” [147]. Такая структура ВКЭ-Сиб может быть объяснена либо долгой эволюционной историей этого субтипа, либо значительной изменчивостью, вызванной необходимостью адаптации вируса к различным региональным особенностям его циркуляции. В пользу первого сценария говорит недавно опубликованная работа, в которой авторы делают вывод о том, что местом происхождения ВКЭ является Сибирь, с последующим формированием субтипов на Дальнем Востоке и в Европе [168]. Тот факт, что в кластероны Азиатской группы (3А, 3С и 3F) входит незначительное количество штаммов из других филогенетических линий, указывает на возможность существования конвергенции в эволюции ВКЭ. Интересно, что мы не наблюдали обратной ситуации, т.е. присутствия штаммов Азиатской филогенетической линии в других группах кластеронов (рис. 4.2, 4.3). Обнаруженная направленность конвергентных изменений (от

потомков к предкам) может указывать на то, что кластерон 3А Азиатской линии может быть основателем ВКЭ сибирского субтипа.

Одним из основных понятий кластеронной структуры является кластерон-«основатель». В рамках кластеронного подхода предполагается, что «основателем» субтипа является самый многочисленный и максимально географически распространенный кластерон. Так, кластероны 1А, 2А и 3А являются основателями для ВКЭ-Дв, ВКЭ-Ев и ВКЭ-Сиб соответственно (табл. 4.1, рис. 4.2, 4.4, Приложения V, VI). Кроме того, данные кластероны имеют наибольшее количество синонимических замен, т.е. обладают наибольшей генетической изменчивостью, что указывает на их первичность в пределах субтипа.

#### *Кластеронная структура в терминах теории квазивидов*

Причины и механизмы формирования кластеронной структуры популяций ВКЭ требуют серьезного осмысления. Один из главных вопросов состоит в том, чем вызвано закрепление в популяции аминокислотных замен в исследованном фрагменте гена Е, соответствующих тому или иному кластерону. Функциональное значение аминокислотных замен, характерных для кластеронов, до сих пор неизвестно. Тот факт, что большинство этих замен расположены на латеральной поверхности гликопротеина Е, свидетельствует о возможности вовлечения этих аминокислот в связывание с рецепторами поверхности клеток клеща [129]. Таким образом, географическая неоднородность в распределении кластеронов может быть результатом адаптации вируса к определенному виду [156], подвиду или даже локальной популяции клещей в ходе коэволюции.

Основываясь на распространенной теории квазивидов в отношении вирусов [126], кластеронную структуру популяций ВКЭ можно рассматривать в виде спектра мутантов или квазивидов с разной

степенью адаптации к клещу (основному хозяину). Широкий диапазон генетической изменчивости (46,4% переменных аминокислотных позиций изученного фрагмента ВКЭ-Сиб) свидетельствует о большом эволюционном потенциале ВКЭ. Результатом такой изменчивости является значительное количество уникальных штаммов (в среднем 18,3% вирусной популяции) (табл. 4.2). Однако, по причине своей уникальности, они не рассматриваются в качестве элементов кластерной структуры. Небольшие кластеры, а также уникальные штаммы являются особой формой равновесия между естественным отбором и мутационным процессом, при котором эти варианты генома ВКЭ (“облака”) упорядочены (сгруппированы) около “мастер”-последовательностей с максимальной приспособленностью - крупных кластеров, таких как 1А, 2А и 3А.

Любая территория, эндемичная по клещевому энцефалиту, характеризуется уникальной кластерной структурой с разным количеством штаммов в кластерах, а также типами их распределения (рис. 4.4). Таким образом, кластерный подход удобен для проведения мониторинга генетической структуры природной популяции ВКЭ и создания локальных и региональных реестров кластеров ВКЭ. Кластерный подход может помочь установить время и движущие силы распространения штаммов ВКЭ и тем самым определить фактическое время появления штаммов на данной территории, объективно рассчитать возраст популяций и скорость их эволюции. Любое статистически достоверное изменение кластерной структуры позволит адекватно прогнозировать развитие эпидемической ситуации, оценить тенденции в развитии региональных особенностей клинических проявлений клещевого энцефалита и разработать тактику специфической и неспецифической профилактики этой инфекции.

#### **4.2. Кластероны как инструмент мониторинга популяций ВКЭ**

Знание о генетической структуре популяций ВКЭ чрезвычайно важно, поскольку является ключом к пониманию закономерностей происхождения и эволюции вируса, а также процессов формирования и поддержания природных очагов клещевого энцефалита. Вопрос о происхождении и эволюции ВКЭ до сих пор остается открытым, поскольку общепринятое ранее представление о клинальном распространения ВКЭ по Евразии с востока на запад [304] в настоящее время подвергается ревизии [168, 274]. Однако, не менее важно изучение процессов формирования и поддержания природных очагов не только на глобальном, но и на региональном и локальном уровнях. В последнее время сразу несколько исследований, основанных на филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей гена Е штаммов ВКЭ-Ев, выделенных в локальных очагах Словении, Швейцарии и Центральной Европы, было посвящено этой теме [132, 143, 292]. Полученные результаты позволили показать филогеографическую связь штаммов ВКЭ на региональном уровне, проследить историю распространения ВКЭ и определить возможные факторы, влияющие на этот процесс.

Очаги КЭ характеризуются разной степенью напряженности: количеством случаев инфицирования, тяжестью протекания заболевания и т.д. В последние десятилетия одной из важнейших проблем природной очаговости в Российской Федерации стали городские или антропоургические очаги КЭ. Доля городского населения в общей заболеваемости КЭ достигает 70% [47]. Для проведения мониторинга и принятия профилактических мер необходимо иметь максимально полное представление о территориальных особенностях возбудителя, в т. ч. о генетическом разнообразии штаммов ВКЭ. Общепринятым подходом для получения такой информации является филогенетический анализ

нуклеотидных последовательностей вирусного генома или его фрагментов. Однако, значительная изменчивость приводит к высокому генетическому разнообразию штаммов, что затрудняет структуризацию вирусных популяций.

Ключевым моментом в комплексном мониторинге эпидемиологической и эпизоотологической ситуации в очагах и понимание связи эпизоотологических характеристик и заболеваемости КЭ является установление и изучение динамики изменения генетической структуры популяций ВКЭ. Это может дать информацию, позволяющую делать как краткосрочные прогнозы, так и разрабатывать сценарии изменения риска заболеваний КЭ в зависимости от проведения профилактических мероприятий, антропогенного и других воздействий на биоценоз, а также предсказать появление новых эпидемически важных вариантов ВКЭ. Современный прогресс в молекулярной биологии и вирусологии позволяет изучать вирус на популяционном уровне, оценивать гетерогенность популяции и влияние этой гетерогенности на основные характеристики вируса, в том числе и патогенетические.

В связи с этим представляется логичным применить разработанный в настоящей работе кластерный подход в качестве инструмента для изучения и мониторинга генетической структуры популяций вируса в природных очагах КЭ на региональном и локальном уровне.

Для проведения подобного исследования по целому ряду причин был выбран Средний Урал, представленный в основном Свердловской областью. Во-первых, на территории Урала регистрируется высокий уровень заболеваемости – 20% от всей заболеваемости в России с ежегодной регистрацией летальных случаев [74]. Во-вторых, на этой территории наблюдение за штаммами ВКЭ ведется на протяжении почти

50 лет (с 1966 года). В-третьих, около трети всех нуклеотидных последовательностей ВКЭ, представленных в GenBank, получены от штаммов, выделенных на этой территории.

За все время наблюдения, начиная с 1966 года, на территории Свердловской области было выделено 387 штаммов ВКЭ-Сиб. Из них 321 (82,9%) были дифференцированы на кластероны. Остальные штаммы были отнесены к группе уникальных (Приложение VI). На Среднем Урале выявлено 14 из 18 известных к настоящему времени кластеронов ВКЭ-Сиб (табл. 4.3). Уральские штаммы ВКЭ-Сиб представлены в основном Азиатской (более 80%) и в меньшей степени Восточно-европейской (около 20%) группой кластеронов (табл. 4.3).

Таблица 4.3

## Разнообразие кластеронов ВКЭ-Сиб на Среднем Урале

Кластероны	Кол-во штаммов	(%)	Филогенетические линии Кол-во штаммов (%)
<b>3A*</b>	<b>191</b>	<b>49,3</b>	Азиатская 257 (80,1)
3C/3C <sup>3**</sup>	11/1	2,8/0,26	
3E	5	1,3	
3F	32	8,3	
3I	11	2,8	
3K	3	0,80	
3L	1	0,26	
3M	1	0,26	
3N	1	0,26	
<b>3D</b>	<b>19</b>	<b>4,9</b>	Восточно-европейская (Балтийская) 64 (19,9)
3B	34	8,8	
3O	3	0,8	
3P	3	0,8	
3Q	5	1,3	
Кластероны	321	82,9	321 (100)
Уникальные	66	17,1	
Всего	387	100	

\* - жирным шрифтом выделены кластероны, формирующие филогенетические линии;

\*\* - 3C<sup>3</sup> принадлежит Восточно-европейской (Балтийской) филогенетической линии

На территории Свердловской области встречаются кластероны, характерные как для Западной Сибири, так и Северо-запада Европейской



части России (табл. 4.3, Приложение VI). Кластероны Бурято-монгольской и Южно-сибирской групп на территории Среднего Урала выявлены не были (рис. 4.5Б).

Разнообразие кластеронов ВКЭ и их распределение по территории являются двумя наиболее существенными характеристиками популяций ВКЭ в природном очаге. Было показано, что в Свердловской области количество кластеронов изменяется в широтном направлении. Так, наибольшее разнообразие (9 кластеронов) приходится на город Екатеринбург и его пригороды, а также южную часть Свердловской области вдоль трассы между городами Екатеринбург и Тюмень. По мере продвижения на север кластеронное разнообразие штаммов ВКЭ существенно снижается. Так, например, в пригородах Нижнего Тагила – второго по величине города Свердловской области – встретилось только пять кластеронов, в Верхотурском и Серовском районах (север области) – лишь по два (рис. 4.5, 4.6). На остальной малонаселенной территории области встречается, как правило, только один кластерон 3А.

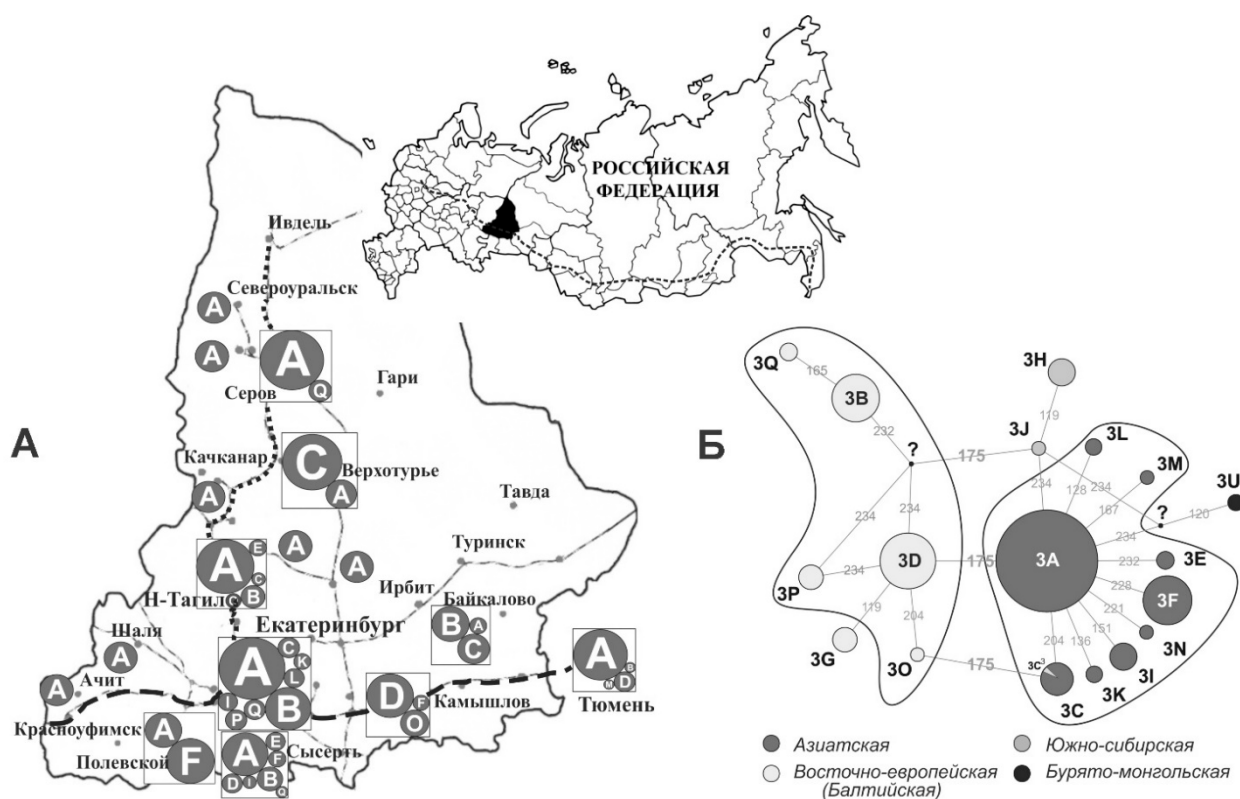


Рис. 4.5. Кластероны ВКЭ-Сиб и их встречаемость в природных очагах Среднего Урала. **А.** Кластеронное разнообразие в отдельных районах Среднего Урала. Площадь круга соответствует доле кластерона в том или ином природном очаге. **Б.** Филогенетическая сеть кластеронов. Группы кластеронов, выявленные на территории Среднего Урала, обведены сплошной линией. Кластероны одной филогенетической линии представлены кругами определенного цвета.

Кластерон 3А Азиатской группы является самым многочисленным по количеству штаммов на Среднем Урале. На его долю приходится 50% всех штаммов, входящих в кластероны (табл. 4.3). Однако, его распределение по территории области не является равномерным. Так, в северных районах области его встречаемость достигает 100%, тогда как в отдельных районах на юге области его доля существенно меньше (Байкаловский, Полевской, Сысертский р-ны), а в некоторых он не встречается совсем (Камышловский р-он) (рис. 4.5А).



Рис. 4.6. Кластерное разнообразие штаммов ВКЭ-Сиб на территории Среднего Урала. Градации серого цвета отражают количество кластеронов.

На примере самого большого кластерона 3А можно максимально достоверно оценить время его появления на Среднем Урале. Возраст штаммов этого кластерона, рассчитанный на основе определенной ранее средней скорости нуклеотидных замен ( $1,56 \times 10^{-4}$  замен на сайт в год) для фрагмента гена Е ВКЭ-Сиб, составил около 312 (263-384) лет. Возраст штаммов кластерона 3А на севере области (севернее Невьянска) немного меньше, чем на юге, и составляет около 270 (227-331) лет. В Западной Сибири возраст штаммов кластерона 3А составляет 383 (323-471) года, а в Пермской области – 241 (203-296) год. Низкое разнообразие кластеронов и относительно недавнее время из появления на севере области отражает

историю освоения этой территории. На юге области пролегает Транссибирская магистраль, связывающая Западную Сибирь с Европейской частью России. Значительное кластеронное разнообразие на юге хорошо согласуется с ранее предложенной гипотезой о решающей роли антропогенного фактора в распространении ВКЭ-Сиб из Западной Сибири по дорогам, соединяющим эту территорию с Европейской частью России (разд. 3.2).

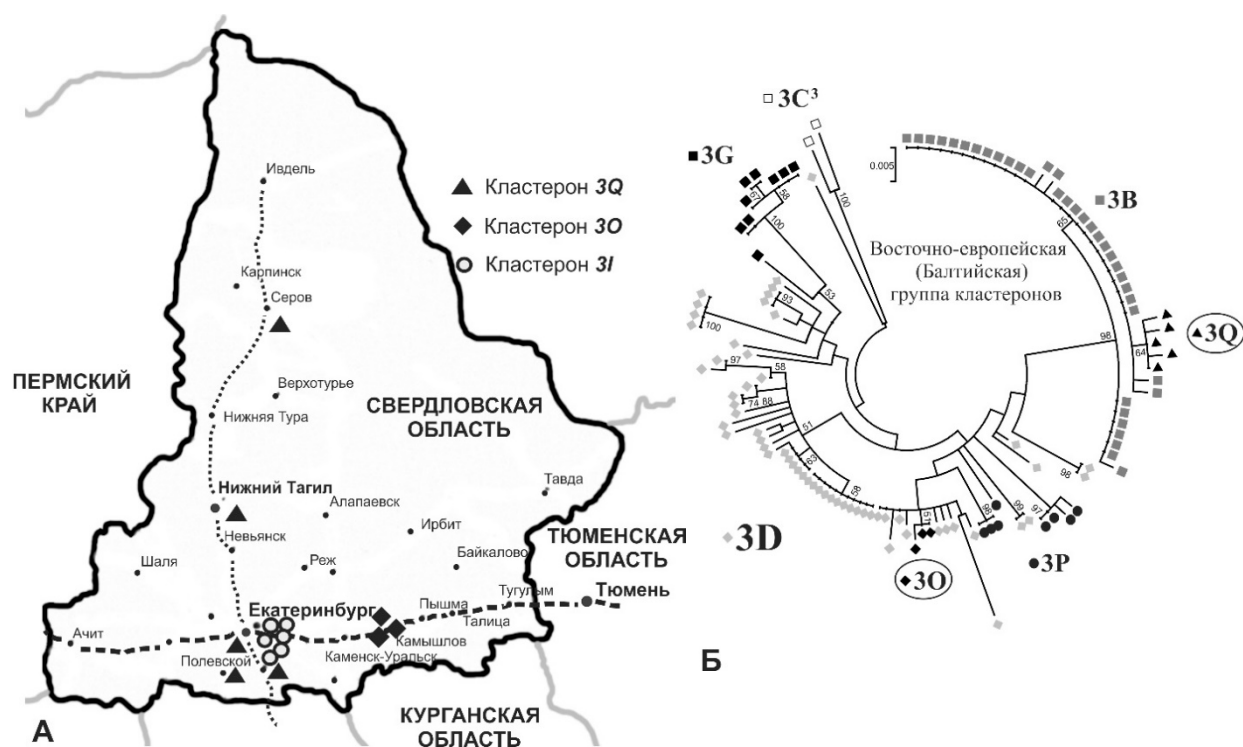


Рис. 4.7. А. Распределение кластеронов 3I, 3O и 3Q на территории Свердловской области. Б. Клональное происхождение кластеронов 3O и 3Q Восточно-европейской (Балтийской) филогенетической линии.

Большинство кластеронов не являются уникальными для территории Среднего Урала. Однако, три кластерона – 3I (Азиатская группа кластеронов), 3O и 3Q (Восточно-европейская группа) – встречаются только на данной территории, поэтому их эволюционная история представляет особый интерес. Филогенетический анализ показал, что эти кластероны имеют клональное происхождение и низкое

генетическое разнообразие штаммов (рис. 4.7). Кластерон 3Q (5 штаммов) имеет коридорный тип распределения с юга на север (примерно 300 км) и встречается только вдоль трассы Екатеринбург-Серов (рис. 4.7А). Кластерон 3Q, по всей видимости, является производным кластерона 3B (рис. 4.7Б), от которого он отличается одной аминокислотной заменой (*Ser* вместо *Phe* в позиции 165 белка E) (табл. 4.1). Возраст кластерона 3Q составляет около 28 (24-37) лет. Кластерон 3O (3 штамма) имеет локальный тип распределения (город Камышлов) и происходит от группообразующего кластерона 3D (рис. 4.7Б). Возраст этого кластерона составляет всего лишь 14 (12-17) лет. Локальный тип распределения характерен также и для кластерона 3I (пригород Екатеринбурга). Возраст кластерона 3I составляет 42 (36-52) года.

Присутствие молодых кластеронов в природных очагах свидетельствует об активном эволюционном процессе, происходящем в популяциях ВКЭ в настоящее время. Филогенетическая близость штаммов в этих кластеронах не оставляет сомнений в их клональном происхождении (рис. 4.7Б). Для молодых кластеронов естественно предположить локальный тип распределения, что подтверждается на примере кластеронов 3O и 3I, однако для кластерона 3Q был отмечен коридорный тип (Рис. 4.7А). Штаммы этого кластерона были обнаружены исключительно вдоль трассы Екатеринбург – Серов протяженностью около 340 км, а также в окрестностях г. Екатеринбурга. На преодоление этого расстояния, исходя из возраста кластерона, должно было уйти около 30 лет. Причины высокой скорости распространения штаммов этого кластерона, а также близость к транспортным путям позволяет предположить, что в основе распространения кластерона 3Q лежит хозяйственная деятельность человека. Признаками этой деятельности

должна быть масштабность и продолжительность во времени, достаточная для переноса штаммов на столь большое расстояние. После тщательного сопоставления времени проводимых на интересующем нас участке долгосрочных масштабных мероприятий, мы пришли к выводу, что распространение штаммов данного кластера произошло в результате строительства автомобильной трассы Екатеринбург – Серов. Строительство велось 11 лет (с 1975 по 1985 гг.) в одном направлении (от Екатеринбурга), преодолевая средним 30 км в год. Домашние животные, синантропные виды зверей и птиц, сопровождавшие бригады дорожных строителей на протяжении всего времени строительства, вероятнее всего, были основной причиной распространения зараженных вирусом клещей на большие расстояния за относительно короткое время. Аргументом в пользу того, что распространение кластера 3Q шло при определенных условиях, связанных со строительством дороги, является пример кластера 3I. Этот кластер распространен в Березовском районе, примыкающем к Екатеринбургу, и территориально соседствует с кластером 3Q. Несмотря на то, что эта территория имеет высокую плотность населения и развитую сеть дорог, 3I все же сохраняет локальный тип распределения, несмотря на свое более раннее происхождение (рис. 4.7А). На этом примере видно, что два кластера, расположенных практически рядом, имеют разную судьбу, которая была определена человеком. Обладают ли молодые кластеры селективным преимуществом перед остальными, внесут ли они изменения в структуру популяции ВКЭ-Сиб в будущем или исчезнут, покажут дальнейшие исследования.

В целом, штаммы ВКЭ-Сиб, входящие в кластеры, имеют клональное происхождение, однако, из этого правила могут быть

исключения. Ранее упоминалось, что незначительное количество штаммов кластеронов 3A, 3C и 3F Азиатской группы принадлежит Восточно-Европейской (Балтийской) и Южно-сибирской филогенетическим линиям ВКЭ-Сиб (раздел 4.1). Более того, на примере все тех же кластеронов 3C и 3F было показано, что они состоят из нескольких клональных групп штаммов (Приложение VIII). Конвергентное появление филогенетически разобщенных штаммов в этих кластерах можно объяснить высокой вероятностью замены аминокислоты *Lys* на *Arg* (позиция 204 для кластера 3C и 228 – для 3F), которая не приводит к изменению физико-химических свойств белка Е. Таким образом, при реконструкции процессов формирования природных очагов КЭ с участием этих кластеронов необходимо учитывать возможность конвергенции и дополнительно проводить филогенетический анализ.

Как видно из рисунка 4.5А, кластеронная структура очага КЭ может быть *гомогенной* и состоять из одного кластера (*монокластеронная*), либо *гетерогенной* и состоять из двух и более кластеронов (*поликластеронная*). Первый тип можно наблюдать на территориях, относительно недавно освоенных и несвязанных с магистральным дорожным сообщением, например, территории на севере и востоке Свердловской области (кластерон 3А). Второй тип характерен для территорий, имеющих богатую историю их освоения, как правило, расположенных на дороге, соединяющей Сибирь и Европейскую часть России или в непосредственной близости от нее, например, юг Свердловской области (рис. 4.5А, 4.6). Поликластеронные очаги КЭ Среднего Урала, по всей видимости, формировались в процессе многократного заноса штаммов вируса из различных областей Западной

Сибири. В гетерогенной структуре очага доминирует обычно один кластерон, как правило, кластерон 3А. Штаммы этого кластерона, вероятно, обладают наибольшей экологической пластичностью.

Каждый очаг КЭ имеет свой уникальный кластеронный профиль, который сформировался при определённых исторических и экологических условиях. Определение этого профиля и составление на его основе молекулярно - эпидемиологического паспорта очага КЭ может стать основой для мониторинга происходящих в нем микро- и макроэволюционных процессов. Конечным результатом использования кластеронов стало создание реестра генофонда штаммов ВКЭ-Сиб в Свердловской области.

Любое изменение кластеронного профиля в природном очаге КЭ (появление нового или исчезновение уже известного кластерона, изменение размеров кластеронов) может свидетельствовать о существовании определенных процессов, влияющих на генетическую структуру вирусной популяции. Понимание этих процессов является первоочередной задачей для проведения краткосрочного прогнозирования, а также предсказания появления новых эпидемически важных вариантов вируса. Кластеронный подход, применяемый для локальных очагов КЭ, может быть с успехом использован для перманентного мониторинга генетической структуры вирусных популяций.

В целом, мониторинг любой вирусной популяции является системой сбора, регистрации, хранения и анализа небольшого количества ключевых показателей, снимаемых периодически и характеризующих популяцию в целом.



Для перманентного мониторинга генетической структуры вирусной популяции мы предлагаем следующие принципы:

1. Основой для анализа является кластерон – клональная группа штаммов, обладающих идентичной аминокислотной последовательностью фрагмента белка E;
2. Показателями являются количественный состав, качественный состав, географическое распределение, время появления кластеронов;
3. Необходима максимально возможная выборка образцов со всех эндемичных территорий;
4. Мониторинг должен проводиться ежегодно на протяжении определенного периода времени;
5. В случае изменения показателей должны быть проведены дополнительные исследования для выяснения вызвавших их причин.

Следует отметить, что кластеронный подход к изучению локальных вирусных популяций очагов КЭ пригоден лишь для решения достаточно узких задач (мониторинг, создание локальных реестров штаммов, изучения процессов, лежащих в основе формирования очага и т.д.). Однако, это не дает полного представления о генезисе очагов КЭ на территории Евразии в целом, поскольку распространение ВКЭ носит глобальный характер. Чтобы реконструировать этот процесс, необходимо сопоставление результатов кластеронного анализа на всем ареале вируса.

Необходимо отметить, что кластеронный подход имеет свои ограничения и не может рассматриваться в качестве альтернативы филогенетическому анализу. Важным его достоинством является формализация наших представлений о структуре вирусных популяций и возможность использовать не только в научных исследованиях, но и службами эпидемиологического надзора. С его помощью можно получать важную информацию, необходимую для реконструкции истории

формирования природных очагов КЭ с оценкой влияния гетерогенности вируса на эффективность средств специфической диагностики и профилактики.

#### **4.3. Квантовая эволюция вируса клещевого энцефалита**

Эпидемиология КЭ тесно связана с экологией и биологией иксодовых клещей. Для циркуляции ВКЭ в природе необходимы клещи, являющиеся основными хозяевами и переносчиками вируса, и позвоночные животные, чья кровь является источником питания клещей и средством передачи ВКЭ от зараженного клеща к незараженному при их питании на одном и том же животном [203].

Единственным механизмом генетической изменчивости ВКЭ является мутационный процесс в виде одиночных нуклеотидных замен. Изменчивость генома вируса вследствие рекомбинаций для клещевых флавивирусов экспериментально не была показана. Скорость накопления мутаций у РНК-вирусов высока и составляет порядка  $10^{-4}$  нуклеотидных замен на сайт в год [174].

На основе филогенетического анализа выделяют три субтипа ВКЭ: ВКЭ-Ев, переносчиком которого является клещ *I. ricinus*, ВКЭ-Дв и ВКЭ-Сиб с переносчиком *I. persulcatus* [129]. Ареалы этих клещей перекрываются, зона симпатрии приходится на значительную часть Восточно-европейской равнины. ВКЭ-Ев широко распространен в Европе и Европейской части России [129, 160, 214]. Штаммы ВКЭ-Дв и ВКЭ-Сиб распространены от Японии и Дальнего Востока России до Прибалтийских стран [185, 214, 231]. Для каждого субтипа ВКЭ характерны определенные аминокислотные замены в белке Е, что лежит в основе приведенной классификации [129].

В настоящее время существует три взаимоисключающих гипотезы о месте возникновения и путях распространения ВКЭ (раздел 1.4). Следует

отметить, что все эти гипотезы основываются на концепции филетического градуализма, согласно которой эволюционные изменения носят равномерный и постепенный характер. В то же время, учитывая высокую скорость накопления мутаций в геноме РНК-содержащих вирусов, сложно представить себе их эволюцию как процесс равномерного накопления мутаций с последующим отбором наиболее благоприятных из них. После формирования в семидесятых годах прошлого века концепции квазивидов у вирусов [123] стало ясно, что вирусные популяции в каждый момент времени генетически и фенотипически неоднородны, предоставляя таким образом богатый материал для естественного отбора. Однако, то, каким образом микроэволюционные события на уровне квазивидов влияют на структуру вирусной популяции в целом и на процесс образования новых генотипов и субтипов вируса, до сих пор остается непонятным. В данном случае кажется логичным объяснить эти процессы не с позиций классического градуализма, а с точки зрения квантовой эволюции, смысл которой заключается в скачкообразном переходе организма из одной адаптивной зоны в другую с резким изменением генетических и фенотипических свойств без промежуточных стадий [271].

В настоящей работе, на основе закономерностей, выявленных при анализе кластерной структуры трех субтипов ВКЭ, теории квазивидов и общих представлений об эволюции РНК-содержащих вирусов, выдвигается гипотеза квантовой эволюции субтипов ВКЭ и других флавивирусов, а также предлагаются механизмы возникновения новых вирусов.

Популяция ВКЭ как совокупность 1104 штаммов всех трех субтипов, чьи нуклеотидные последовательности фрагмента гена Е зарегистрированы в GenBank, была представлена в виде кластерной структуры (рис. 4.8). Как было показано ранее на примере ВКЭ-Сиб, данная

структура отражает как фенотипические, так и филогенетические связи между кластерами (разд.4.1). Кластеронная структура ВКЭ состоит из трех доменов, соответствующих субтипам: ВКЭ-Дв, ВКЭ-Ев и ВКЭ-Сиб (рис. 4.8). Кластеронные структуры субтипов ВКЭ имеют общее строение. В основе лежит наибольший по численности кластерон-«основатель» (1А, 2А, 3А), а по периферии располагаются существенно меньших размеров производные кластероны первого, второго и т.д. уровней, отличающиеся от «основателя» на одну, две и более аминокислотные замены. Кластеронные структуры ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев устроены относительно просто и имеют один кластерон-«основатель»: 1А и 2А соответственно. Структура ВКЭ-Сиб сложнее и состоит из трех субдоменов, которые соответствуют трем филогенетическим линиям. Так, кластерон-«основатель» 3А формирует субдомен, соответствующий Азиатской филогенетической линии, а 3А<sup>2</sup> и 3D – Южно-Сибирской и Восточно-Европейской (Балтийской) соответственно (рис. 4.8, табл. 4.4).

Пространственно-временной анализ кластеронной структуры популяций ВКЭ выявил ряд закономерностей. Во-первых, в ней обнаружена возрастная иерархия: кластероны - «основатели» всегда старше, чем производные от них кластероны (табл.4.4).

Во-вторых, наблюдается возрастная иерархия и между кластерами - «основателями» в структуре ВКЭ: 1А>(3А<sup>2</sup>>3А>3D)>2А, соответствующая правилу «чем западнее, тем моложе». Возраст самого «старого» кластерона - «основателя» 1А ВКЭ-Дв составляет более 650 лет, а самого «молодого» - 2А ВКЭ-Ев – около трехсот лет, причем 3А<sup>2</sup>, 3А, 3D ВКЭ-Сиб занимают промежуточное положение: 423, 367 и 310 лет соответственно (табл. 4.4).

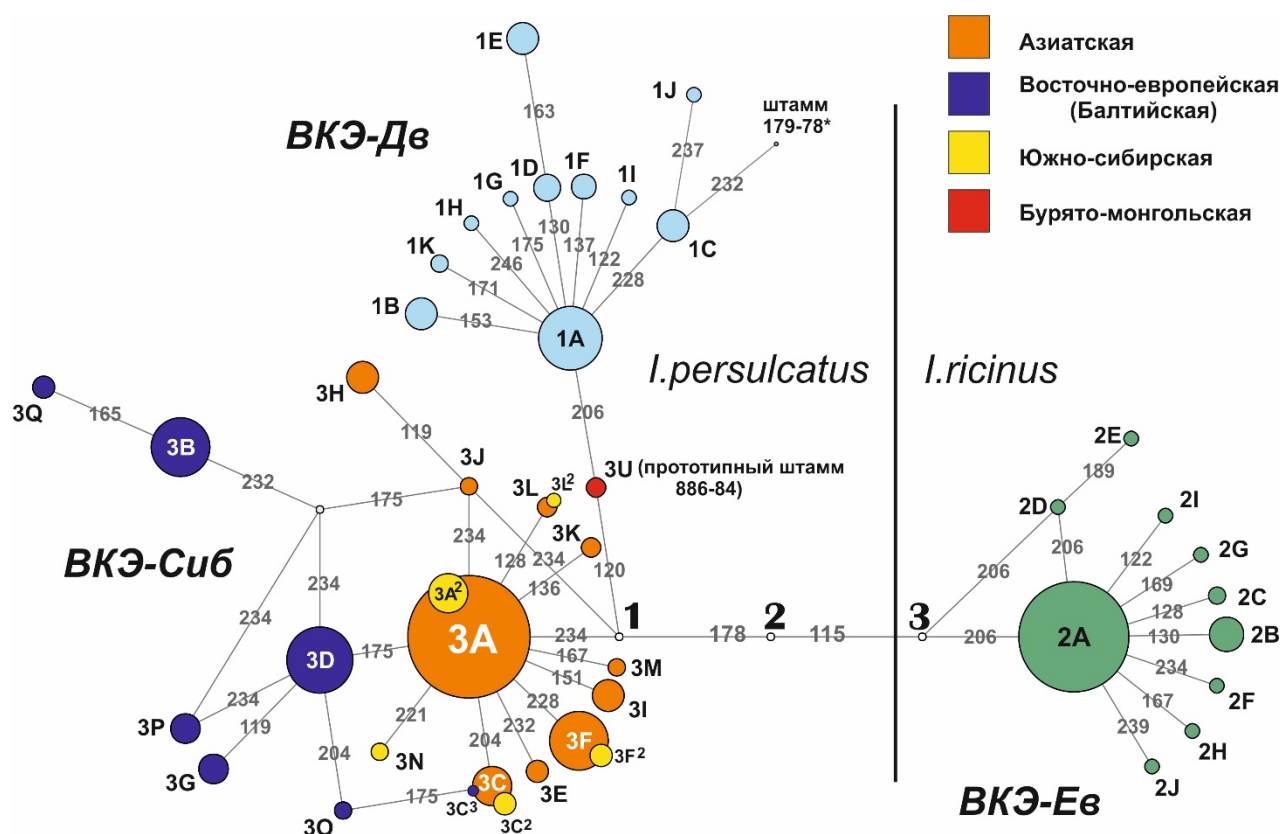


Рис. 4.8. Филогенетическая сеть кластеронов ВКЭ, построенная на основе последовательностей фрагмента белка Е всех трех субтипов. Цифрами 1, 2, 3 обозначены «точки перехода», цветом – субтипы ВКЭ и филогенетические линии внутри ВКЭ-СиБ.

В-третьих, было показано, что кластеронные структуры субтипов ВКЭ связаны между собой через кластероны – «основатели» переходами, состоящими из нескольких аминокислотных замен (рис. 4.8). Так, кластерон 1A ВКЭ-Дв связан с 3A ВКЭ-СиБ тремя переходами через кластерон 3U и *точку перехода* 1. В то же время 1A и 3A связаны с кластероном 2A ВКЭ-Ев пятью и четырьмя переходами соответственно, включая *точки перехода* 1, 2 и 3. За исключением кластерона 3U, представленного штаммами Бурято-Монгольской филогенетической линии (прототипный штамм 884-84) (Приложение VI), мы не обнаружили ни одного штамма, чья аминокислотная последовательность фрагмента белка Е соответствовала хотя бы одной из трех точек перехода. Важно отметить, что *точка перехода* 1 связывает все кластеронные структуры ВКЭ (рис. 4.8).

Таблица 4.4

## Возраст основных кластеронов генотипов ВКЭ

Кластероны (кол-во штаммов)*	Количество синоним. замен	Максимальная генетическая дистанция (в количестве нуклеотидных замен)	Возраст (годы)
<b>ВКЭ-Дв</b>			
<b>1A (64)</b>	<b>103</b>	<b>47</b>	<b>664 (560-815)</b>
1B (9)	18	18	254 (214-312)
1C (4)	46	38	536 (452-659)
1D (3)	0	0	недавно
1E (5)	1	1	недавно
1F (3)	0	0	недавно
1H (8)	1	1	недавно
<b>ВКЭ-Сиб</b>			
<i>Азиатская группа</i>			
<b>3A (300)</b>	<b>138</b>	<b>26</b>	<b>367 (309-451)</b>
3C (13)	33	21	296 (250-364)
3F (40)	57	21	296 (250-364)
3J (4)	22	21	296 (250-364)
3H (13)	33	18	254 (214-312)
3K (8)	22	16	226 (190-277)
3N (3)	19	17	240 (202-294)
3V (3)	13	12	169 (143-208)
3E (5)	14	14	197 (166-242)
3M (4)	15	14	197 (166-242)
3I (11)	3	3	42 (36-52)
<i>Южно-сибирская группа</i>			
<b>3A<sup>2</sup> (19)</b>	<b>51</b>	<b>30</b>	<b>423 (357-520)</b>
<i>Восточно-европейская (Балтийская) группа</i>			
<b>3D (58)</b>	<b>71</b>	<b>22</b>	<b>310 (262-381)</b>
3G (9)	12	12	169 (143-208)
3P (8)	15	11	155 (131-191)
3B (36)	6	3	42 (36-52)
3Q (5)	3	2	28 (23-34)
3O (4)	1	1	14 (12-17)
<i>Бурято-монгольская группа</i>			
<b>3U (4)</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>85 (71-104)</b>
<b>ВКЭ-Ев</b>			
<b>2A (164)</b>	<b>103</b>	<b>23</b>	<b>325 (273-398)</b>
2B (23)	24	14	197 (166-242)
2C (7)	17	14	197 (166-242)
2F (9)	15	13	184 (155-225)

\* Кластероны численностью менее трех штаммов не показаны.

Структура популяции ВКЭ, представленная в виде кластеронов, может быть интерпретирована в рамках теории квазивидов, разработанной для описания генетической гетерогенности вирусных

популяций [123]. Так, кластерон – «основатель» в структуре субтипа ВКЭ представляет собой совокупность штаммов, чья аминокислотная последовательность фрагмента белка Е обладает максимальной приспособленностью и является «мастер» - последовательностью. Производные кластероны, обладающие умеренной приспособленностью, и уникальные штаммы, у которых она минимальна, представляют собой «облака» или спектр мутантов (рис. 4.8). Принимая во внимание тот факт, что производные кластероны разных уровней всегда моложе кластерона – «основателя» (табл. 4.4), включение их нуклеотидных последовательностей в расчёт возраста субтипа будет приводить к его необоснованному завышению. Это верно также и для уникальных штаммов, появляющихся в результате генерации спектра мутантов вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (табл. 4.4). Исходя из вышеизложенного, можно допустить, что реальный возраст субтипа ВКЭ соответствует возрасту его кластерона – «основателя».

Рассматривая структуру всей популяции ВКЭ через возрастную иерархию кластеронов ( $1A > (3A^2; 3A) > 2A$ ) и следуя правилу «чем западнее, тем моложе», можно сделать заключение о том, что реальный возраст ВКЭ соответствует возрасту самого «старого» кластерона – «основателя», т.е. 1А ВКЭ-Дв, насчитывающему более 650 лет (табл. 4.4). Следовательно, первые очаги КЭ появились на Дальнем Востоке, что соответствует ранее выдвинутой гипотезе о клинальном распространении ВКЭ с востока на запад Евразии [304].

#### *Расчет эволюционных возрастов*

Все существующие на сегодняшний день гипотезы эволюции ВКЭ основаны на теории филетического градуализма, в то время как в данной работе предлагается рассматривать её с точки зрения теории квантовой

эволюции. Обе эти теории предполагает разные подходы к расчету эволюционных возрастов, разница между которыми продемонстрирована на рис. 4.9. Филетический градуализм основан на том допущении, что накопление мутаций в геноме происходит с относительно постоянной скоростью, и позволяет формально интерпретировать длины ветвей филогенетических деревьев как генетические дистанции, отделяющие существующие вирусные штаммы от их общего вымершего предка (рис. 4.9А). В таком случае возраст ВКЭ может быть оценен в 1500 лет. Однако, такой формально-арифметический подход, по нашему мнению, не может быть продуктивным и самодостаточным, поскольку полностью игнорирует ряд фундаментальных общебиологических закономерностей, включая неравномерность эволюционного процесса, коэволюцию вирусов, их хозяев и переносчиков и т.д. Даже пользующийся популярностью среди исследователей Байесовский подход анализа нуклеотидных последовательностей, реализованный в пакете программ BEAST, строит филогении на основе все той же модели молекулярных часов [128], что делает его непригодным для изучения квантовой эволюции ВКЭ. Процесс квантовой эволюции, предполагающей существование быстрых (квантовых) переходов и периодов градуальной эволюции, сложно представить в виде филогенетического древа, поскольку переход между таксонами происходит за счет нелинейного накопления мутаций, и длины ветвей отражают лишь степень дивергенции, но не время её происхождения (рис. 4.9Б). В таком случае возраст может быть рассчитан только на участках градуальной эволюции, т.е. отдельно для каждой группы филогенетически близких штаммов. При этом предполагается, что непосредственный предок этих групп



принадлежит той же самой группе, что и его потомки. В этом случае возраст ВКЭ оценивается не более чем в 700 лет. Скорость же накопления мутаций на этапе перехода в другую адаптационную зону в естественных условиях расчёту не поддается в силу непредсказуемости направления эволюционных изменений. Поэтому «реальный» возраст субтипов ВКЭ, по-видимому, не соответствует расчетам многих исследователей, определивших время их появления в несколько тысяч лет. Дальнейшие расчеты возрастов проводятся внутри кластероносов как филогенетически тесно связанных групп штаммов, имеющих общего предка.

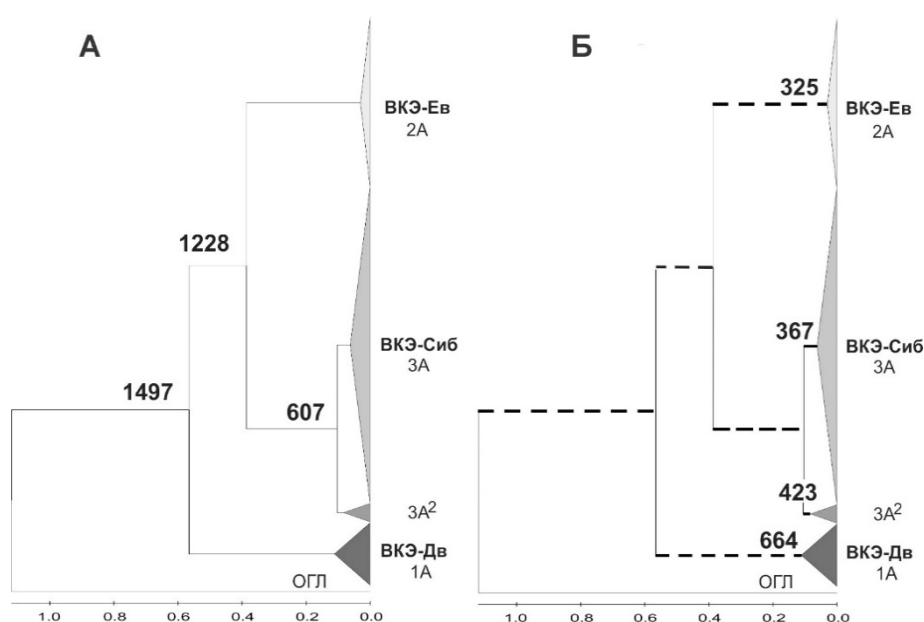


Рис. 4.9. Два подхода к расчету времени эволюции ВКЭ: **А.** в случае филетического градуализма, когда таксоны происходят от общего предка в ходе равномерной эволюции; **Б.** в случае предлагаемой гипотезы квантового перехода из одной адаптивной зоны в другую. Возникновение нового субтипа ВКЭ в таком случае происходит непосредственно из исходного в короткий период времени.

### Происхождение ВКЭ-Ев и ВКЭ-Сиб

Согласно нашим расчетам, возраст ВКЭ-Ев составляет немногим более 300 лет (табл. 4.4.), т.е. время его возникновения практически совпадает со временем появления штаммов ВКЭ-Сиб на Северо-Западе России в результате колонизации европейцами Западной Сибири в начале XVII века (раздел 3.2). Важная особенность Северо-Западной части России состоит в том, что данная территория является зоной симпатрии клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus*. Следовательно, можно предположить, что ВКЭ-Ев появился из ВКЭ-Сиб не за счет равномерного накопления мутаций за длительный период времени (филетический градуализм), а в результате адаптивного скачка при смене вирусом основного членистоногого хозяина. Данное предположение соответствует теории квантовой эволюции, согласно которой видообразование носит скачкообразный характер и происходит в короткий период времени [271].

В этом случае встает важный вопрос о механизме квантового видообразования у клещевых флавивирусов и условиях перехода вируса из одной адаптивной зоны в другую. Поскольку размножение вируса в «чужом» («новом») хозяине малоэффективно [263], наиболее вероятным представляется сценарий, основанный на феномене образования гибридов между близкими видами клещей рода *Ixodes*. Ранее было показано, что в лабораторных условиях в результате межвидового скрещивания клещей евразийских видов *I. ricinus* к *I. persulcatus* образуются гибриды первого поколения (F1). Межвидовые гибриды (МГ) были полностью стерильны при скрещивании между собой и с клещами родительских видов [5]. Предполагаемая репродуктивная изоляция близких видов рода *Ixodes*, по-видимому, обусловлена их генетической несовместимостью, так как морфологических преград для межвидовых спариваний и переноса сперматофоров не было выявлено [5]. Естественно

предположить, что МГ могут появляться с определенной частотой в природе на территории Северо-Запада России и Прибалтийских стран в зоне симпатрии *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Поскольку гибриды обладают генотипами обоих видов, то они несут как «персулькатусные», так и «рицинусные» фенотипические признаки, одновременное присутствие которых у одной особи, по всей вероятности, обеспечивает необходимые условия для запуска механизма квантовой эволюции, приводящего к возникновению нового субтипа ВКЭ (ВКЭ-Ев) (рис. 4.10). При этом «персулькатусный» фенотип обеспечивает эффективное размножение ВКЭ-Сиб, в то время как другой – «рицинусный» – такой способностью не обладает. Известно, что размножение РНК-вирусов сопровождается появлением большого спектра дефектных (мутантных) вирусов за счет неспособности РНК-зависимой РНК-полимеразы корректировать неправильно включенные нуклеотиды при репликации вирусного генома [176]. Однако, дефектные вирусы могут поддерживаться в вирусной популяции благодаря хорошо известному феномену комплементации - негенетического взаимодействия двух вирусов, репродуцирующихся в одной и той же клетке [78, 237]. В этих условиях в ходе направленного отбора мутаций будет накапливаться пул новых вирусов, адаптированных к «рицинусному» фенотипу и способных к самостоятельному размножению (рис. 4.10). Впоследствии такие вирусы, в случае попадания из МГ в клещей *I. ricinus* при их совместном питании, могут начать самостоятельно и эффективно циркулировать в популяции последних.

Таким образом, время, необходимое для появления нового вируса, равно продолжительности жизненного цикла клеща и составляет от одного года (от стадии личинки) до пяти-шести лет, при условии наличия диапауз в цикле развития межвидового гибрида. Можно предположить и более продолжительный отрезок времени, необходимый для появления

нового вируса (нескольких десятков лет), но только при условии регулярного появления МГ на одной территории в количествах, достаточных для обеспечения длительной циркуляции в них ВКЭ-Сиб и дефектного вируса.

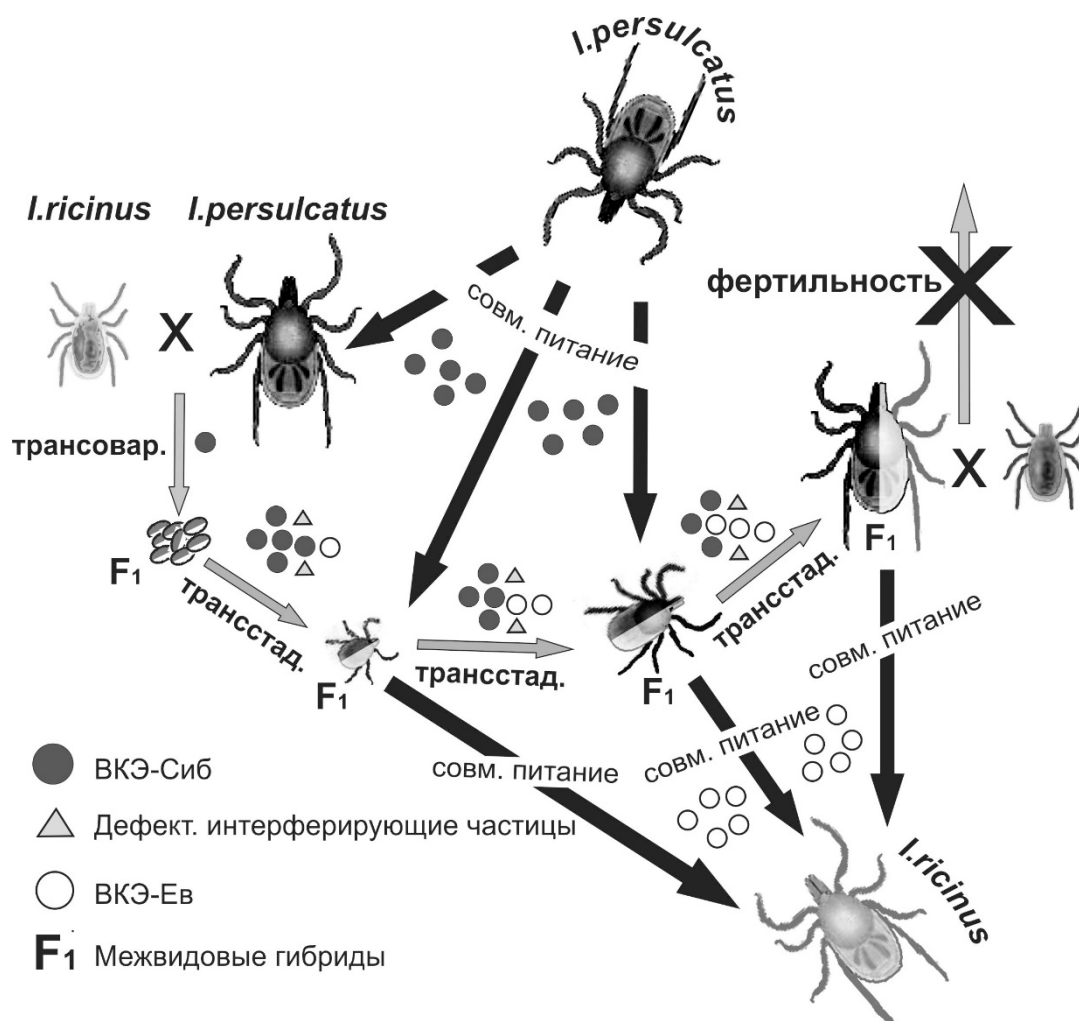


Рис. 4.10. Возможный механизм возникновения ВКЭ-Ев из ВКЭ-Сиб как элемент квантовой эволюции в зоне симпатрии ареалов клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* на территории Европейской части России.

Безусловно, одним из важнейших вопросов эволюции ВКЭ является происхождение ВКЭ-Сиб. Как видно из кластеронной структуры и согласно правилу «чем западнее, тем моложе», следует, что ВКЭ-Сиб происходит от ВКЭ-Дв (рис. 4.8). Возникновение ВКЭ-Сиб из кластерона – «основателя» 1А ВКЭ-Дв сопровождается двумя переходами, которым

соответствуют кластероны *3U* и *точка перехода 1* (рис. 4.8). На первый взгляд, так как переносчиком ВКЭ-Сиб и ВКЭ-Дв является один вид клещей *I. persulcatus*, трудно предположить возникновение ВКЭ-Сиб в результате смены членистоногого хозяина (как в случае ВКЭ-Ев). Однако, было показано, что в пределах ареала *I. persulcatus* существует выраженная географическая изменчивость морфометрических показателей между личинками, нимфами и взрослыми особями клещей, собранных с территории Карелии, Алтая, Саян, Тянь-Шаня и Дальнего Востока [65]. Такая изменчивость предполагает существование внутривидовой структуры *I. persulcatus*, состоящей как минимум из двух субпопуляций или рас – западной (территория до Байкала) и восточной (Дальний Восток). Зона их симпатрии, предположительно, расположена в Забайкалье на территории Бурятии, Северной Монголии, Забайкальского края и Иркутской области. Межрасовые гибриды, как правило, плодовиты и, следовательно, должны встречаться с высокой частотой в зоне симпатрии. Согласно предлагаемой гипотезе квантовой эволюции ВКЭ, в таких гибридах может появиться переходная форма вируса, способная длительное время самостоятельно циркулировать в межрасовых гибридах *I. persulcatus*. Такой промежуточной формой вируса является кластерон *3U* (рис. 4.8), так как штаммы данного кластерона (прототипный штамм 886-84) встречаются исключительно на территориях, примыкающих к Байкалу, а их генетические особенности дают основания некоторым исследователям выделить их в отдельный субтип ВКЭ [120, 121] (Приложение VI). Таким образом, промежуточными формами при возникновении ВКЭ-Сиб из ВКЭ-Дв могли стать кластерон *3U* и *точка перехода 1*, которая, как и в случае с ВКЭ-Ев, является ключевой для появления нового субтипа (рис. 4.8).

Анализ филогенетических данных (рис. 4.9Б) показывает, что эволюционная история ВКЭ-Сиб сложна и включает как минимум два события независимого происхождения филогенетических линий. Первое событие имело место около 400 лет назад и привело к формированию Южно-сибирской филогенетической линии (кластерон  $3A^2$ ), а второе – около 350 лет назад с образованием Азиатской филогенетической линии (кластерона  $3A$ ) (рис. 4.8, 4.9Б, табл. 4.4). При этом дифференциация этих линий ВКЭ-Сиб не связана с географической изоляцией, поскольку современные их ареалы в значительной степени перекрываются. Примечательным является тот факт, что, несмотря на значительную филогенетическую дистанцию между штаммами двух линий, наблюдается идентичность их фенотипа, т.е. аминокислотной последовательности, о чем свидетельствует существование кластеронов  $3A$  и  $3A^2$ ,  $3C$  и  $3C^2$ ,  $3F$  и  $3F^2$  и т.д. (рис. 4.8). Данный феномен может свидетельствовать о детерминированности эволюционного процесса ВКЭ-Сиб, проходящего в одинаковых экологических условиях. Иными словами, два независимых эволюционных сценария, нашедших отражение в различных филогенетических линиях ВКЭ-Сиб, реализуются в виде одного и того же фенотипа.

Вероятно, подобная картина наблюдается и для ВКЭ-Ев. Так, при анализе генетического разнообразия было отмечено, что штамм Рап филогенетически обособлен от остальных штаммов ВКЭ-Ев [56]. Кроме того, недавно были найдены близкие ему штаммы ВКЭ-Ев, выделенные на территории Крыма и Северо-западного Причерноморья [75, 76]. Примечательно, что все эти штаммы принадлежат кластерону-«основателю»  $2A$ . Таким образом, возможно, что в истории ВКЭ-Ев, так же, как и ВКЭ-Сиб, было два независимых эволюционных события, приведших путем конвергенции к формированию одного и того же фенотипа ВКЭ-Ев.

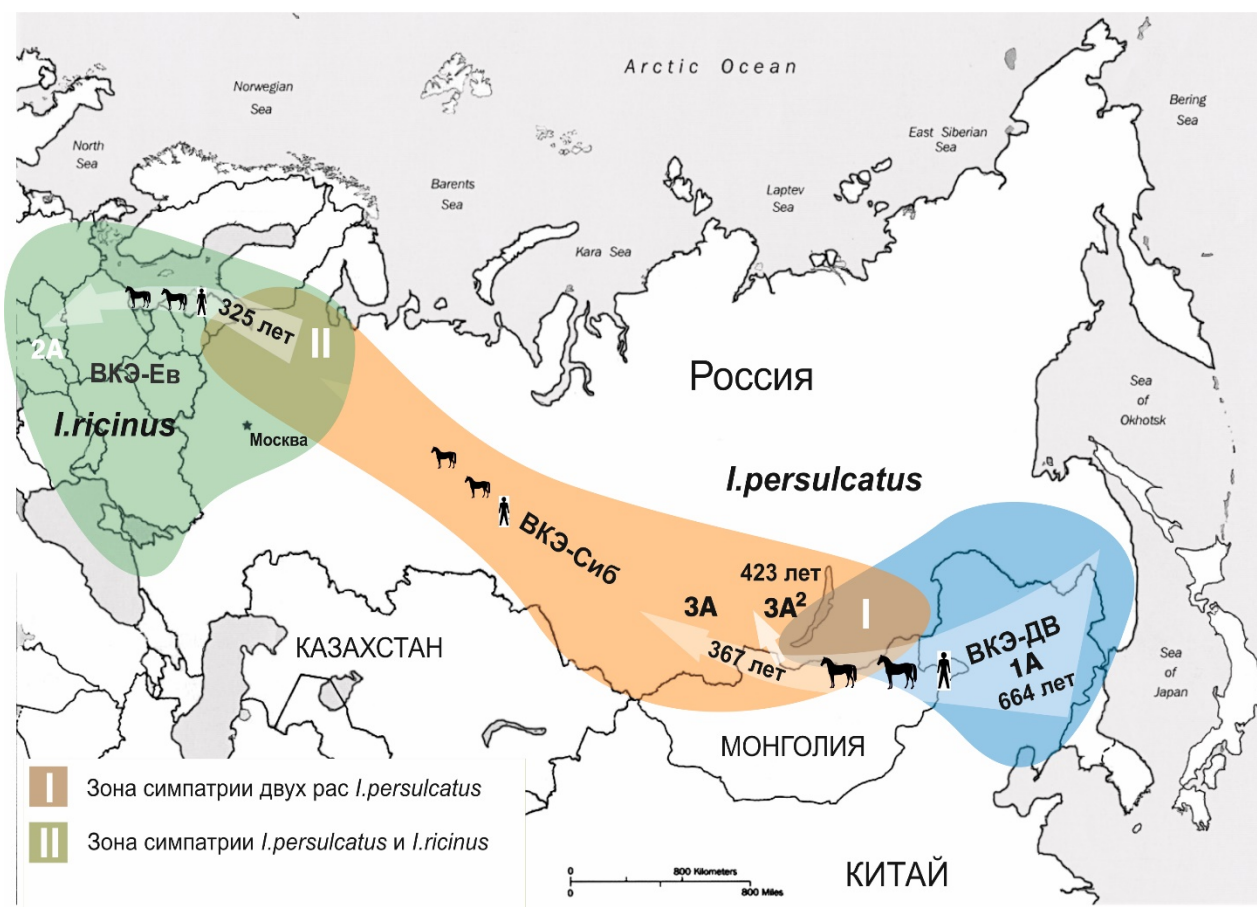


Рис. 4.11. Сценарий эволюции ВКЭ. Показаны предполагаемые пути распространения вируса, связанные с действием антропогенного фактора, а также рассчитанные возраста субтипа. Цветом выделены ареал *I. ricinus*, предполагаемые ареалы двух рас *I. persulcatus*, а также зоны их перекрывания (симпатрии).

Исходя из вышеизложенного, эволюция ВКЭ, насчитывающая не более 700 (560-815) лет, может быть представлена как процесс последовательного возникновения одного субтипа из другого в результате квантовой эволюции (рис. 4.11). Движущей силой распространения вируса по территории Евразии, по всей видимости, был антропогенный фактор. Так, штаммы самого «старого» субтипа ВКЭ-Дв распространились в Забайкалье из первичных очагов Дальнего востока за счет функционирования торговых путей между Маньчжурским государством и народностями, населявшими территорию Забайкалья и Западной Сибири в средние века [107]. От этих штаммов в результате

перехода на новую расу переносчика *I. persulcatus* около 400 лет назад произошел сибирский субтип, дальнейшее распространение которого по территории Урала, Северо-Запада России и стран Балтии связано со временем колонизации европейцами Сибири в начале XVII века (раздел 3.2). Попадание данного субтипа в зону симпатрии *I. persulcatus* и *I. ricinus* спровоцировало второй этап квантовой эволюции ВКЭ, в результате которого образовался европейский субтип (около 300 лет назад). После своего возникновения ВКЭ-Ев быстро распространился по ареалу клещей *I. ricinus*, чему способствовала высокая плотность населения и развитая сеть дорог.

#### *Механизм квантовой эволюции.*

Главная проблема гипотезы квантовой эволюции ВКЭ касается механизма появления новых генотипов вируса, значительные генетические различия которых (15% генома и более) возникли за короткий по эволюционным меркам промежуток времени (предположительно, несколько лет). Разрешение этой проблемы, по нашему мнению, лежит в свойствах пространственной организации вторичной и третичной структуры геномной РНК флавивирусов. Известно, что вторичная структура РНК чувствительна к возникновению мутаций. Эффекты, вызываемые появлением синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен, определяются местом их возникновения [224, 280], которое может соответствовать расположению регуляторных элементов РНК, а также особенностями вторичной структуры, измененной в результате их появления. Анализ полноразмерных кодирующих последовательностей генома ВКЭ выявил многочисленные значимые корреляции при возникновении синонимичных и несинонимичных нуклеотидных замен, что доказывает существование сложных взаимодействий между различными участками вирусной РНК [60]. Обнаруженные случаи корреляции распределяются



неравномерно вдоль последовательности и затрагивают удаленные друг от друга части генома, кодирующие разные белки [60].

Ген Е, кодирующий гликопротеин вирусной оболочки, является ведущим элементом эволюции клещевых флавивирусов, поскольку аминокислотная последовательность именно этого белка определяет уникальный механизм взаимодействия вируса с клеточным рецептором и, вероятно, в первую очередь подвергается отбору при адаптации вируса к новому хозяину. Другие вирусные белки в меньшей степени подвержены отбору, особенно неструктурные, поскольку их свойства проявляются внутри клетки, универсальны и мало зависят от вида хозяина. Учитывая значение вторичной и третичной структур вирусной РНК для эффективности размножения вируса, можно предположить, что критические мутации в гене Е, возникающие в результате адаптации ВКЭ к новому для вируса клеточному рецептору, дестабилизируют пространственную организацию геномной РНК у части вирусных частиц. Эти вирусные частицы дефектны, т.к. неспособны самостоятельно размножаться, но сохраняются в вирусной популяции благодаря феномену комплементации (раздел 1.5.3). В результате в ряду вирусных поколений начинает работать отбор, направленный на сохранение как мутаций, стабилизирующих пространственную структуру РНК, так и адаптивных мутаций в гене Е. Отбор идет до достижения дефектным вирусом способности к самостоятельному эффективному размножению, то есть до появления нового вируса и может проходить очень быстро.

Ключевым моментом предлагаемой гипотезы эволюции ВКЭ является предположение о том, что «молекулярные часы» при возникновении нового субтипа в результате смены вида хозяина идут с огромным ускорением, т.е. новый вирус возникает за короткий промежуток времени, иными словами скачкообразно, в виде «квантового» перехода из одной адаптивной зоны в другую. Важное преимущество гипотезы квантовой эволюции состоит в возможности ее

экспериментальной проверки. Действительно, если гипотеза верна, то в межвидовых гибридах клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* или в смешанных культурах их клеток в присутствии штамма ВКЭ-Сиб возможно зарегистрировать как возникновение нового вируса, так и его переходные формы.

В заключение отметим, что предлагаемая гипотеза носит универсальный характер и дает возможность объяснить и спрогнозировать появление не только новых субтипов, но и новых видов арбовирусов, что, несомненно, может иметь важнейшее практическое значение. Понимание закономерностей эволюционного процесса позволит определить его направленность и тем самым облегчит борьбу с КЭ и другими трансмиссивными вирусными инфекциями.

#### **4.4. Гибридизация клещей комплекса *I. ricinus* в природных популяциях в зонах их симпатрии**

##### **4.4.1. Гибридизация клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в симпатрических популяциях Западной Сибири**

В настоящее время межвидовая гибридизация среди животных считается довольно обычным явлением и хорошо изучена у отдельных таксонов – как позвоночных, так и беспозвоночных. Помимо гибридизации, выделяют также явление интрогрессии, т.е. потока генов между гибридизующимися популяциями, образующегося за счет постоянного скрещивания гибридов с особями одного (однонаправленная интрогрессия) или обоих родительских видов (двунаправленная интрогрессия). Гибридизация не всегда сопровождается интрогрессией генов, так, в случае стерильности гибридов первого поколения интрогрессии не происходит [259].

Таксономические и филогенетические исследования иксодовых клещей осложняются существованием групп морфологически близких видов со сходными видовыми диагностическими признаками. Кроме того, близкие виды иксодид часто имеют обширные симпатрические ареалы. При глобальном изменении климата, а также при антропогенной трансформации ландшафтов нарушается приуроченность многих видов клещей к естественным биотопам, в результате чего два и более видов клещей могут одновременно паразитировать на одних и тех же хозяевах. Хотя вероятность встречи особей разных видов в таких условиях достаточно велика, данных о возможности межвидовой гибридизации и распространенности в природе межвидовых гибридов клещей имеется очень мало [84, 256]. Способность к гибридизации клещей рода *Ixodes* в природе практически не исследована, главным образом потому, что выявить гибридные особи на основании морфологических признаков, особенно после нескольких возвратных скрещиваний, крайне сложно [91, 256]. Для подтверждения гибридизации и выявления интрогрессии ядерных и митохондриальных генов в настоящее время используются молекулярные методы, в частности, аллозимный анализ, микросателлитный анализ, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, секвенирование нуклеотидных последовательностей фрагментов генов ядерной и мтДНК. При этом анализ ядерных маркеров позволяет выявить гибриды, в то время как анализ митохондриальных маркеров указывает на направление гибридизации и интрогрессии [259].

Поиск феномена естественной гибридизации клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* молекулярно-генетическими методами во многом сдерживался результатами, полученными на основе морфометрических

измерений половых органов самцов и самок, а также данными о различиях в экологии этих клещей. Хотя оба эти вида клещей могут использовать в качестве прокормителей широкий спектр позвоночных хозяев, у них была отмечена определенная хозяйинная специализация на половозрелой стадии. Так, имаго *I. persulcatus* чаще обнаруживаются на грызунах и крупных млекопитающих, в то время как *I. pavlovskyi* предпочитает птиц [68]. В итоге было сформировано представление о том, что в области симпатрии этих клещей действует комплексный многоступенчатый механизм репродуктивной изоляции: морфологические препятствия для скрещивания подстрахованы физиологическими, а те и другие – расхождением видов на половозрелой стадии по таксономическим группам хозяев, что исключает оплодотворение самок *I. pavlovskyi* самцами *I. persulcatus* в процессе питания [68].

В настоящей работе мы впервые представляем молекулярно - генетические доказательства существования в природе гибридов первого поколения (F1), беккроссов с разным уровнем интрогрессии ядерной ДНК, а также возможность митохондриальной интрогрессии между близкородственными видами клещей рода *Ixodes* (*I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*) в области их симпатрии.

Клещи в количестве 783 взрослых особей (383 самки и 400 самцов) (табл. 4.5) были собраны на флаг в Томской области (Западная Сибирь), вблизи города Томска в июне 2013 и 2014 годов в районе трех населенных пунктов: д. Богашево (56°20'N 85°08'E), д. Коларово (56°20'N 84°56'E) и д. Казанка (56°18'N 84°58'E) (Рис. 4.12).

### Анализ митохондриальной ДНК (*cox1*)

Нами было проведено определение видовой принадлежности клещей (*I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*) методом ПЦР-РВ с общими праймерами и видоспецифичными зондами к полиморфному участку митохондриального гена цитохром с-оксидазы *cox1* (рис. 4.13). В результате 437 (55,8%) особей были определены как *I. persulcatus*, 346 (44,2%) особей – как *I. pavlovskyi*. Хотя в целом *I. persulcatus* встречался чаще, однако в районе Богашево доминировал *I. pavlovskyi* (67%). Таким образом, исследованная территория является областью симпатрии этих двух видов иксодовых клещей.



Рис. 4.12. Карта, показывающая места сбора клещей.

Стратегия исследования популяций иксовых клещей в зоне симпатрии *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* для выявления межвидовых гибридов и интрогрессии мтДНК приведена на схеме (рис. 4.13).

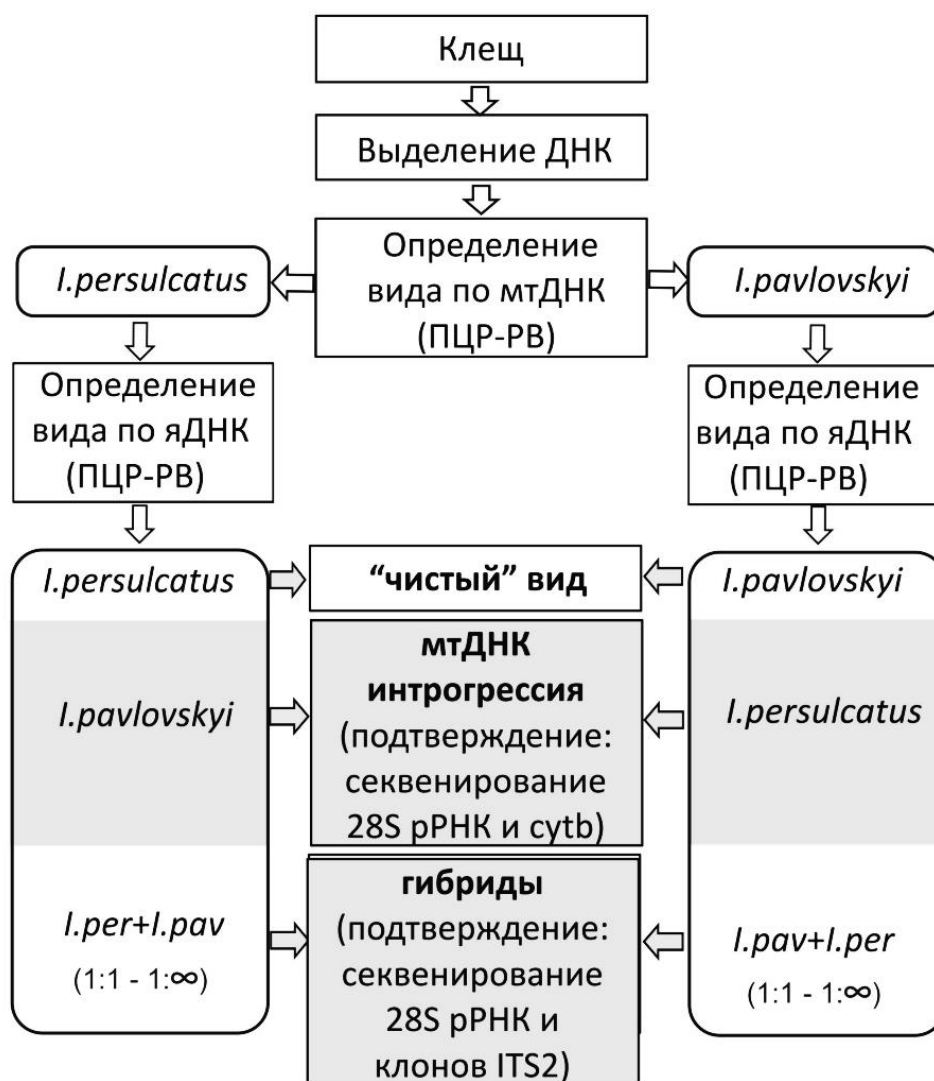


Рис. 4.13. Схема исследования популяций иксовых клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* для выявления межвидовых гибридов и интрогрессии мтДНК в зоне симпатрии.

#### Анализ ядерной ДНК (ITS2)

После определения вида клещей по мтДНК те же образцы были исследованы методом ПЦР-РВ с видоспецифичными зондами к ядерному внутреннему транскрибируемому спейсеру 2 (ITS2) *I. persulcatus* и *I.*

*pavlovskyi*. Результаты определения видов по ядерному маркеру отличались от таковых, полученных с помощью мтДНК: 447 (57,1%) особей было отнесено в виду *I. persulcatus*, а 257 (32,8%) – к *I. pavlovskyi*. При этом 79 (10,1%) образцов имели аллели обоих видов, т.е. являлись гибридами (табл. 4.5). Выборочное клонирование ПЦР-продуктов выявленных гибридов, включающих полную последовательность ITS2 длиной около 825 п. н., с последующим их секвенированием полностью подтвердило результаты ПЦР-РВ по определению видовой принадлежности аллелей.

Таблица 4.5

Результаты определения видовой принадлежности исследуемых клещей по митохондриальному и ядерному маркерам

мтДНК	ядНК			Всего
	<i>I. pavlovskyi</i>	<i>I. persulcatus</i>	Гибриды	
<b><i>I. pavlovskyi</i></b>	<b>252</b> 112♀, 140♂ (32,2%)	<b>39</b> 11♀, 28♂ (5,0%)	<b>55</b> 43♀, 12♂ (7,0%)	<b>346</b> 166♀, 180♂ (44,2%)
<b><i>I. persulcatus</i></b>	<b>5</b> 1♀, 4♂ (0,6%)	<b>408</b> 201♀, 207♂ (52,1%)	<b>24</b> 15♀, 9♂ (3,1%)	<b>437</b> 217♀, 220♂ (55,8%)
<b>Всего</b>	<b>257</b> 113♀, 144♂ (32,8%)	<b>447</b> 212♀, 235♂ (57,1%)	<b>79</b> 58♀, 21♂ (10,1%)	<b>783</b> 383♀, 400♂ (100%)

Анализ ПЦР-РВ кривых амплификации аллелей ITS2 позволяет обнаружить как гибриды F1 (соотношение аллелей 1:1), так и беккроссы с разным уровнем интрогрессии данного участка генома клещей (рис. 4.14).

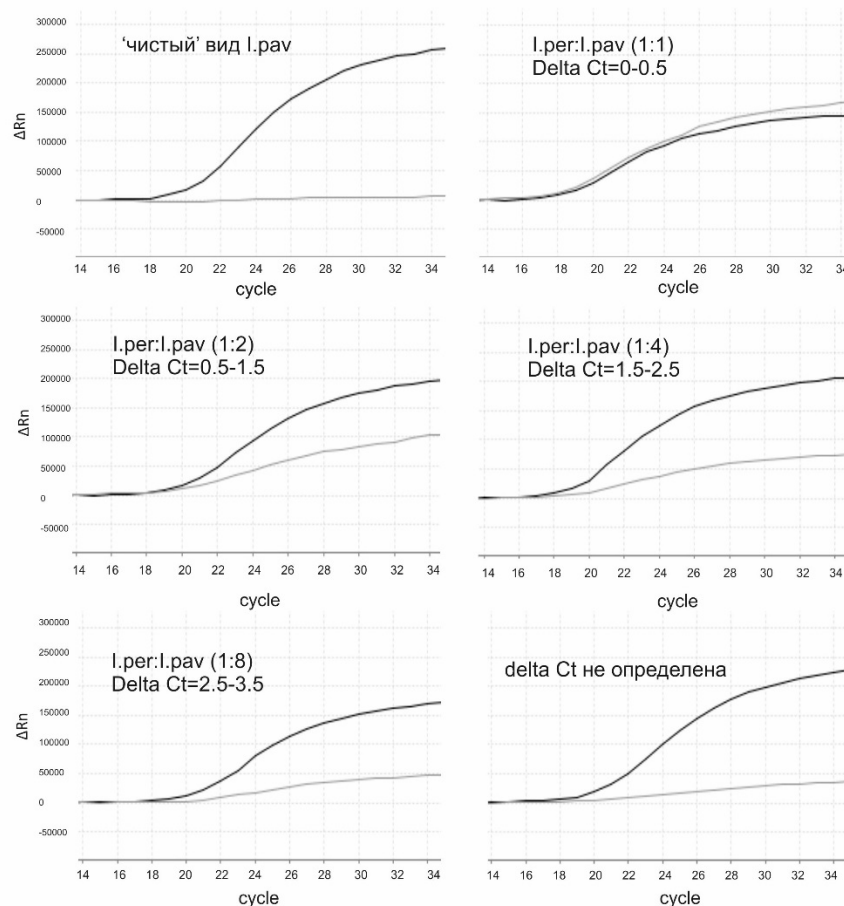


Рис. 4.14. Кривые нарастания флуоресцентного сигнала при проведении ПЦР-РВ с видоспецифичными зондами для амплификации аллелей ITS2 экспериментальных смесей ДНК клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в разных соотношениях, впоследствии наблюдаемые в природных образцах.

Достоверность полученных данных была подтверждена данными ПЦР-РВ скрининга клонов ITS2 гибридов с разным уровнем интрогрессии. Таким образом, из всех выявленных гибридов 20 (25,3%) были гибридами первого поколения (F1). Беккроссы, у которых доля ITS2-аллелей *I. pavlovskyi* была выше, чем доля аллелей *I. persulcatus* (44), встречались в 3 раза чаще, чем наоборот (15) (табл. 4.6).



Таблица 4.6

Соотношение полов среди F1 гибридов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, а также беккроссов с разным соотношением аллелей ITS2

Пол	F1 (1:1)	Соотношение аллелей <i>I. persulcatus</i> : <i>I. pavlovskyi</i>				Соотношение аллелей <i>I. pavlovskyi</i> : <i>I. persulcatus</i>				Всего
		2:1	4:1	8:1	∞: 1	2:1	4:1	8:1	∞: 1	
Гибриды с мтДНК <i>I. pavlovskyi</i>										
♀	15	0	0	0	2	11	11	4	0	43
♂	1	0	0	0	3	0	0	2	6	12
Гибриды с мтДНК <i>I. persulcatus</i>										
♀	4	0	0	0	4	3	2	1	1	15
♂	0	1	0	2	3	0	2	0	1	9
Всего	20	1	0	2	12	14	15	7	8	79

Для подтверждения наличия гибридов, найденных на основе анализа ITS2, был секвенирован участок D3 домена 28S рРНК у четырех случайно выбранных гибридов F1. Во всех случаях полученные последовательности были смесью двух последовательностей 28S рРНК (в соотношении 1:1), которые отличались на две видоспецифичные нуклеотидные замены (позиции 41 (Т/С) и 88(Т/С) относительно JQ085392).

Для определения генетической изменчивости аллелей ITS2 разных видов у гибридных особей были определены последовательности клонов ITS2 (всего 41 последовательность) (рис. 4.15). Нуклеотидные последовательности размещены в базе данных GenBank под следующими номерами: KP241976 – KP242016 (Приложение IX). Средняя генетическая дистанция между последовательностями аллелей ITS2 *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* внутри одной гибридной особи F1 (образцы 1970-14 и 2030-14) составила D=0.0140 и D=0.0235 соответственно. В целом, генетическая изменчивость оказалась крайне высокой – из 21 ITS2-аллеля *I. persulcatus* было обнаружено только два с одинаковой последовательностью, то же

самое отмечено для 16 аллелей *I. pavlovskyi*. Кроме того, были выявлены «необычные» аллели, три из которых (KP242004, KP242005, KP241980) оказались филогенетически ближе к *I. nipponensis*, а одна (KP242015) занимала промежуточное положение между *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* на филогенетическом дереве (рис. 4.15).

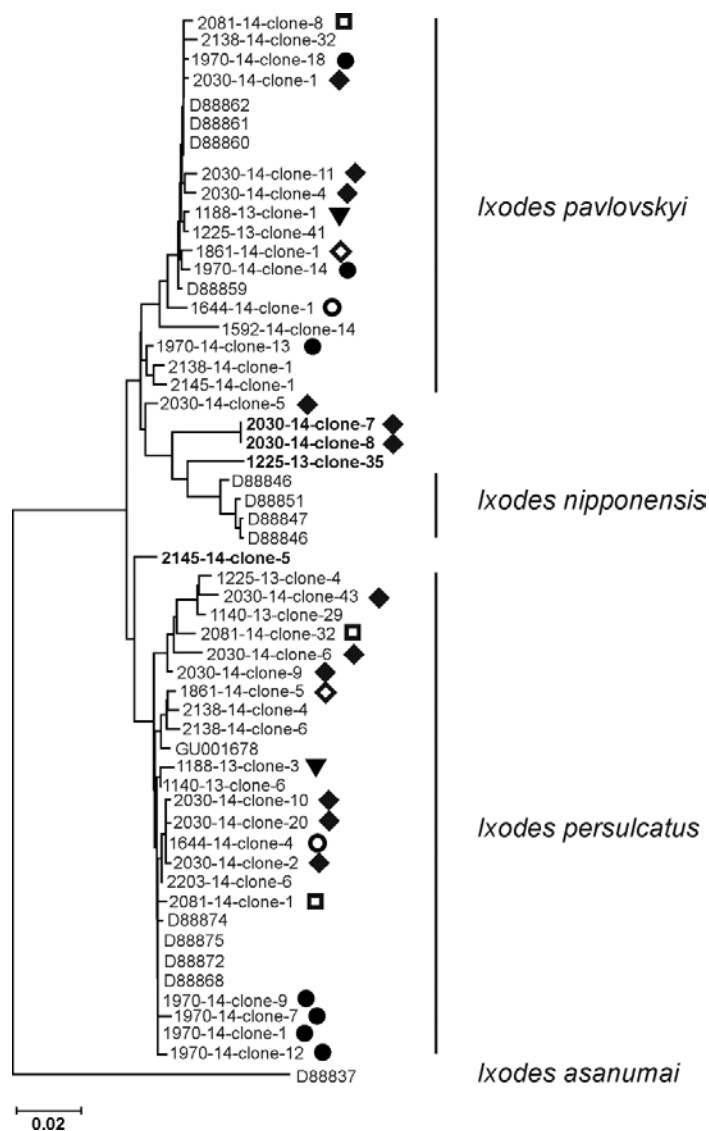


Рис 4.15. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей ITS2 (длина около 825 н.п.) и показывающее принадлежность аллелей гибридов к родительским видам *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*. Одинаковыми символами обозначены последовательности, принадлежащие одному образцу клещей, «необычные» аллели выделены жирным шрифтом. В качестве внешней группы взята нуклеотидная последовательность ITS2 клеща *I. asanumai* (D88837).

### Интрогрессия мтДНК

Сравнение видовой принадлежности клещей в исследуемой популяции по мтДНК (ген *cox1*) и ядерной ДНК (ITS2) (за исключением гибридов) показало наличие интрогрессии мтДНК. Так, среди 257 клещей, определенных как *I. pavlovskyi* по ядерной ДНК, 5 особей (1,95%) имели мтДНК *I. persulcatus*. Аналогично, среди 447 клещей, отнесенных к *I. persulcatus* по ядерной ДНК, 39 особей (8,7%) имели мтДНК *I. pavlovskyi*. Следует отметить, что у гибридов F1 мтДНК *I. pavlovskyi* встречалась в четыре раза чаще, чем мтДНК *I. persulcatus* (табл. 4.6).

Для подтверждения наличия интрогрессии мтДНК нами была исследована дополнительная пара маркеров: митохондриального (*cytb*) и ядерного (28S рРНК). Последовательности фрагментов этих генов были определены для семи образцов, у которых была зафиксирована интрогрессия мтДНК. Во всех случаях нуклеотидные последовательности ядерного и митохондриального маркеров указывали на принадлежность к разным видам (дендрограмма не приведена).

### Соотношение полов у гибридов

В исследованных популяциях клещей обоих видов соотношение самцов и самок было приблизительно одинаковым (табл. 4.5). Однако, у выявленных гибридов F1 95% (19 из 20) составляли самки (табл. 4.6). Сравнение количества самок и самцов у гибридов с разным соотношением аллелей ITS2 двух видов обнаружило интересную закономерность. Из таблицы 4.6 видно, что в случае относительно высоких соотношений долей аллелей двух видов гибридные особи представлены самками, однако при низкой доле аллелей одного из видов (1:16 и ниже) количество самцов увеличивается и сравнимо с количеством самок.

Наши данные показывают, что комплексный многоступенчатый механизм репродуктивной изоляции, предположенный для *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*, по всей видимости, не является строгим и при определенных условиях может нарушаться. Об этом говорит тот факт, что более 10% популяции клещей в исследованной области симпатрии этих видов представлен гибридами F1 и беккроссами с разным уровнем интрогрессии ядерной ДНК другого вида. Определить поколение гибридов с соотношением аллелей, отличным от 1:1, не представляется возможным из-за многочисленных копий рибосомальных генов в геноме клещей и, соответственно, их неменделевского расщепления при наследовании [242]. Существование многочисленных беккроссов, а также наличие интрогрессии мтДНК, являющееся следствием фертильности гибридов F1, свидетельствует об отсутствии строгой генетической изоляции между *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*.

В исследуемой симпатрической популяции клещей Томской области, по всей вероятности, интрогрессия ядерных генов и митохондриальной ДНК между видами может осуществляться в обоих направлениях, однако, с разной эффективностью, т.е. быть асимметричной. Анализ частот встречаемости беккроссов с разным уровнем интрогрессии ядерной ДНК второго вида, а также данные по интрогрессии мтДНК позволяют считать более вероятным спаривание самок *I. pavlovskyi* с самцами *I. persulcatus*, а не наоборот (табл. 4.5). Наши результаты противоречат полученным ранее морфометрическим данным Филипповой Н.А., согласно которым имеется несоответствие размеров половых органов у голодных самок *I. pavlovskyi* и самцов *I. persulcatus*, что должно препятствовать их спариванию [68]. В то же время в работе Филипповой Н.А. отмечается тот факт, что копуляция клещей данной пары все же возможна в случае

изменения размеров половых органов самки во время питания на хозяине [68]. Следовательно, наличие гибридов может свидетельствовать также и об отсутствии репродуктивной изоляции, связанной с хозяйинной специализацией этих видов в исследованных биотопах.

Обнаруженный феномен практически полного доминирования самок как у гибридов F1, так и беккроссов с относительно высокой долей содержания ITS2-аллелей обоих видов, дает основания предполагать, что в случае межвидового скрещивания *I. pavlovskyi* и *I. persulcatus* наиболее жизнеспособными оказываются самки. Причем половой отбор самок справедлив как для пары ♀ *I. pavlovskyi* x ♂ *I. persulcatus*, так и для пары ♀ *I. persulcatus* x ♂ *I. pavlovskyi* (Таблица 4.6). В силу ярко выраженной асимметрии соотношения полов у гибридов в пользу самок, очевидно, что основным механизмом поддержания гибридной популяции является возвратное скрещивание гибридных самок с самцами родительских видов.

Выборочное клонирование и последующее секвенирование аллелей ITS2 у гибридов выявило высокую изменчивость нуклеотидных последовательностей даже внутри одной особи (рис. 4.15). Это расширяет наши представления о внутривидовой генетической изменчивости этих видов. Из 41 одного клонированного аллеля ITS2 *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* 38 оказались уникальными по нуклеотидной последовательности. Особого внимания заслуживает тот факт, что несколько аллелей имели филогенетическую близость с аллелями *I. nipponensis* (рис. 4.15). Эта находка является подтверждением ранее сделанного вывода о тесном филогенетическом родстве клещей *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и *I. nipponensis*, основанного на сравнительных онтогенетических данных [63, 135].

Наши данные свидетельствуют о том, что использование только митохондриальных маркеров может привести к ошибкам в определении

вида клеща, например, при проведении эпидемиологических исследований в зонах симпатрии. Таким образом, для изучения видовой структуры клещей из симпатрических популяций предпочтительнее использовать либо ядерные маркеры, либо комбинацию ядерных и митохондриальных маркеров.

Подтверждение наличия гибридов в симпатрических популяциях близкородственных видов клещей имеет значение не только для филогеографических исследований. В таких популяциях могут создаваться уникальные условия для быстрой эволюции возбудителей природно-очаговых инфекций вирусной и бактериальной природы, адаптированных только к одному виду переносчика. Наличие множественных промежуточных форм между двумя видами клещей в виде беккроссов облегчает переход возбудителя на другого переносчика за счет направленного отбора адаптивных мутаций в его геноме. Критическое количество таких мутаций в итоге может привести к переходу возбудителя на новый вид хозяина («host jump»). Таким образом, молекулярно-генетические доказательства наличия межвидовых гибридов иксодовых клещей является аргументом в пользу предлагаемой гипотезы происхождения субтипов ВКЭ за счет адаптивного скачка, связанного с гибридами в зоне симпатрии двух видов (или рас) клещей (раздел 4.3). В частности, предполагается, что именно таким путем европейский субтип ВКЭ (основной хозяин *I. ricinus*) произошел из сибирского субтипа (основной хозяин *I. persulcatus*) в области симпатрии клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* (Северо-Запад России и страны Балтии).

Поскольку переход на нового хозяина может выразиться в усилении патогенных свойств возбудителя и негативно сказаться на эпидемическом состоянии природного очага, мы считаем, что необходимо

учитывать роль гибридных популяций клещей в эволюции переносимых ими возбудителей. Кроме того, при эпидемиологических исследованиях трансмиссивных инфекций, циркулирующих в области симпатрии близкородственных видов клещей, особое внимание необходимо уделять учету гибридных особей – их численности и степени зараженности.

#### **4.4.2. Гибридизация клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* в симпатрических популяциях на территории Эстонии**

В предыдущем разделе обсуждались молекулярно-генетические доказательства существования межвидовых гибридов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в зоне их симпатрии на территории Западной Сибири. Однако для того, чтобы оценить распространенность и масштабность этого феномена, необходимо было доказать возможность гибридизации не только между филогенетически близкими видами (как в случае *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*), но и более отдаленными, например, *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Было показано, что данные виды не имеют морфологических препятствий для спаривания и в зонах симпатрии используют одних и тех же прокормителей на всех стадиях своего развития [67]. Однако, представление о стерильности экспериментально полученных межвидовых гибридов первого поколения [5] и безуспешность попыток найти в природе гибриды этих видов клещей морфометрическими методами [135] надолго затормозили поиск гибридов клещей в симпатрических популяциях. Тем не менее, в 2014 году методом дискриминантного анализа внешних морфологических признаков личинок клещей была показана возможность существования гибридных личинок в области симпатрии *I. ricinus* и *I. persulcatus* [100].

В настоящей работе мы провели исследование симпатрической популяции клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* для обнаружения межвидовых гибридов, а также определения структуры гибридных популяций по схеме, предложенной для пары *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* (раздел 4.4.1).

#### *Определение вида клещей по морфологическим и генетическим признакам*

Было проведено определение видовой принадлежности 265 нимф и имаго клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus*, собранных на территории Эстонии (рис. 4.16), тремя методами: 1) изучение морфологических признаков; 2) ПЦР-РВ с видоспецифичными зондами к полиморфному участку митохондриального гена *cox1*; 3) ПЦР-РВ с видоспецифичными зондами к ядерному маркеру ITS2. Результаты представлены в таблице 4.7. Генетические методы определения позволили разделить всех изученных особей на три группы: 1) «чистые» виды: и мтДНК, и яДНК принадлежат одному виду; 2) гибриды по яДНК (аллели обоих видов); 3) гибриды и по яДНК, и по мтДНК. Среди особей, морфологически определенных как *I. ricinus*, только 72,1% оказались «чистыми» *I. ricinus*, в то время как для *I. persulcatus* процент правильности морфологического определения оказался значительно выше – 99,3%. Данный факт связан с тем, что 24,6% клещей, морфологически определенных как *I. ricinus*, оказались гибридными особями. В 2,5% случаев было обнаружено несовпадение морфологического и генетического определения вида (табл. 4.7).



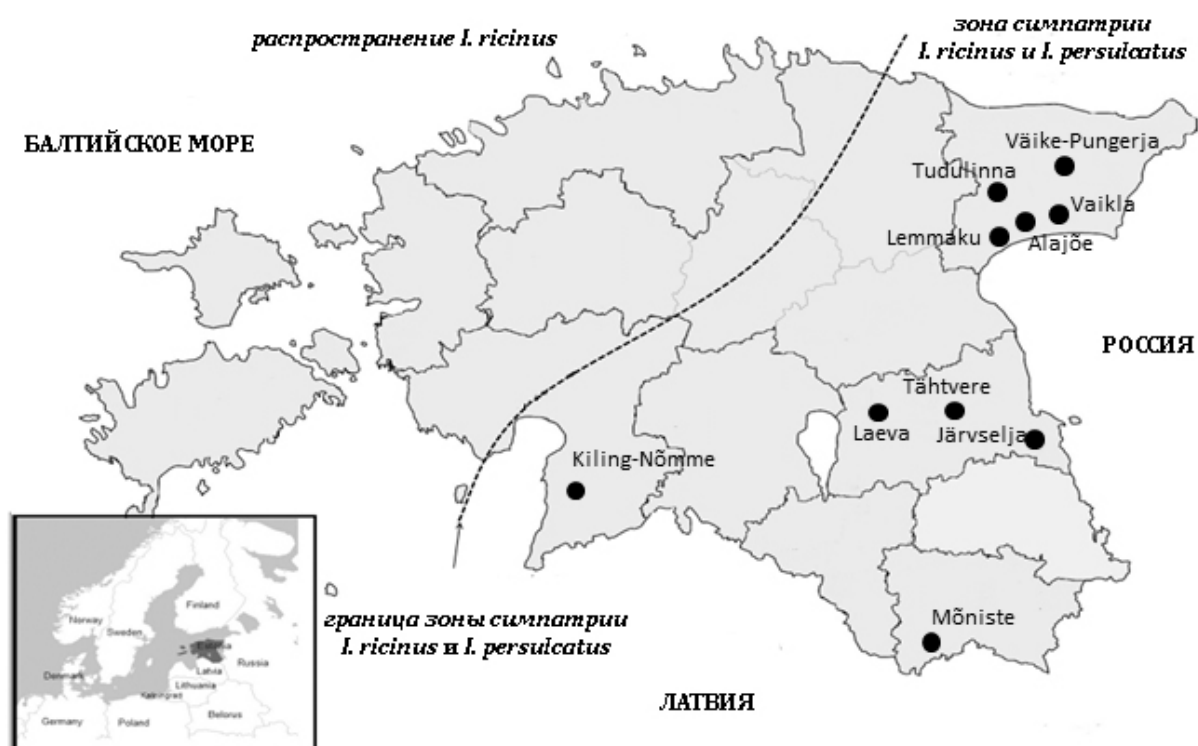


Рис. 4.16. Карта Эстонии, на которой показана граница ареалов клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus*, а также места сбора клещей.

Таблица 4.7

Соответствие морфологического и генетического методов определения видовой принадлежности клещей

Морфология клещей	«Чистый» вид		Гибриды (яДНК)	Гибриды (яДНК/мтДНК)
	<i>I. ricinus</i>	<i>I. persulcatus</i>		
<i>I. ricinus</i> <b>122</b> <b>(46,0%)</b> (50N, 35♀, 37♂)	<b>89</b> <b>(72,9%)</b> (37N, 25♀, 27♂)	<b>3</b> <b>(2,5%)</b> (2N, 1♀)	<b>25</b> <b>(20,5%)</b> (7N, 8♀, 10♂)	<b>5</b> <b>(4,1%)</b> (4N, 1♀)
<i>I. persulcatus</i> <b>143</b> <b>(54,0%)</b> (17N, 71♀, 55♂)	<b>0</b>	<b>142</b> <b>(99,3%)</b> (17N, 71♀, 54♂)	<b>1</b> <b>(0,7%)</b> (1♂)	<b>0</b>

#### Обнаружение гибридов

Молекулярно-генетический анализ позволил обнаружить 31 гибридную особь (11,7%), обладающую аллелями как *I. ricinus*, так и *I. persulcatus* (табл. 4.8). При этом 23 особи обладали мтДНК *I. ricinus*, 3 особи – *I. persulcatus*, а 5 – обоих видов (наличие двух пулов мтДНК в одном клеще было подтверждено секвенированием фрагмента гена *cytb*) (табл. 4.8).

Таблица 4.8

Результаты определения видовой принадлежности исследуемых клещей по митохондриальному и ядерному маркерам

мтДНК	яДНК			Всего
	<i>I. ricinus</i>	<i>I. persulcatus</i>	Гибриды	
	<b>89</b>		<b>23</b>	<b>112</b>
<i>I. ricinus</i>	37N, 25♀, 27♂ (33,6%)	<b>0</b>	7N, 6♀, 10♂ (8,7%)	44N, 31♀, 37♂ (42,3%)
		<b>145</b>	<b>3</b>	<b>148</b>
<i>I. persulcatus</i>	<b>0</b>	19N, 72♀, 54♂ (54,7%)	2♀, 1♂ (1,1%)	19N, 74♀, 55♂ (55,8%)
			<b>5</b>	<b>5</b>
Смесь	<b>0</b>	<b>0</b>	4N, 1♂ (1,9%)	4N, 1♂ (1,9%)
	<b>89</b>	<b>145</b>	<b>31</b>	<b>265</b>
Всего	37N, 25♀, 27♂ (33,6%)	19N, 72♀, 54♂ (54,7%)	11N, 8♀, 12♂ (11,7%)	67N, 105♀, 93♂ (100%)

Для определения соотношения аллелей в образцах был проведен анализ специально подготовленных смесей образцов ДНК «чистых» видов *I. persulcatus* и *I. ricinus* в различных пропорциях: 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, с преобладанием одного или другого вида. Анализ кривых амплификации показал, что аллели *I. ricinus* не могут быть количественно оценены на основе  $\Delta C_t$  в присутствии аллеля другого вида, возможно, по причине конкуренции двух ПЦР за одни и те же праймеры. В результате мы не смогли точно определить, какие из гибридных особей являются гибридами F1, а какие – беккроссами.

Для подтверждения феномена гибридизации было проведено выборочное клонирование ПЦР-продуктов трех образцов ДНК гибридов, включающих полную нуклеотидную последовательность ITS2 длиной около 825 п. н. (115 клонов). У трех выбранных гибридов по результатам проверки ПЦР-РВ соотношение клонов аллелей ITS2 *I. ricinus* к *I. persulcatus* составило приблизительно 1:4 (870-06, 15 клонов), 2:1 (1512-07, 46 клонов) и 12,5:1 (3717-3-08, 54 клон). Таким образом, три исследованных

гибрида, вероятно, являются беккроссами с разным уровнем интрогрессии яДНК.

Для подтверждения видовой принадлежности аллелей ITS2 были определены нуклеотидные последовательности клонов ITS2 трех гибридных особей (21 последовательность), а также двух особей «чистых» видов (14 последовательностей). Нуклеотидные последовательности размещены в базе данных GenBank под номерами: KR136379 – KR136414 (Приложение X). На основании полученных последовательностей, а также последовательностей ITS2 из GenBank была построена филогенетическая дендрограмма (рис. 4.17).

Следует отметить, что два аллеля ITS2 гибридной особи 870-06 (клоны 1-1 и 1-3), относящиеся к *I. ricinus*, филогенетически значительно отличались от других аллелей (рис. 4.17). Визуальный анализ данных последовательностей позволил установить их химерную природу: 80% всей длины (5'-конец) соответствовали аллелям ITS2 *I. ricinus*, а 20% – ITS2 *I. persulcatus* (3'-конец).

Для независимого подтверждения наличия гибридов, найденных на основе анализа ITS2, нами был секвенирован участок D3 домена 28S рРНК у трех исследованных гибридных особей. Во всех случаях полученные последовательности были смесью двух последовательностей 28S рРНК, которые отличались на одну видоспецифичную нуклеотидную замену (позиция 41 (Т/С) относительно последовательности FR874103).

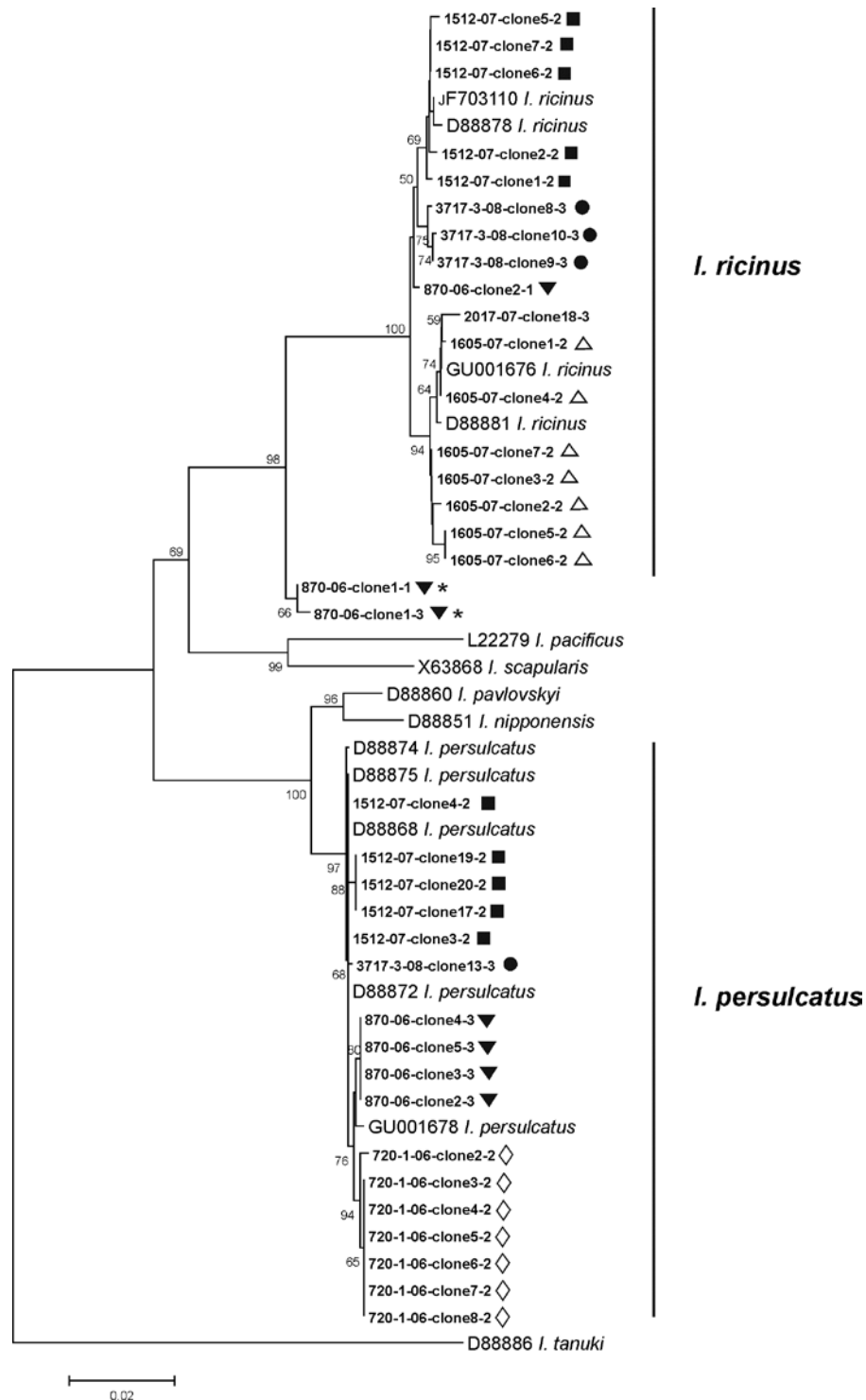


Рис. 4.17. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей ITS2 родственных видов клещей рода *Ixodes* и показывающее принадлежность аллей гибридных особей к родительским видам *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Символами отмечены индивидуальные образцы клещей, при этом белые символы соответствуют «чистым» видам, а черные – гибридным особям. Химерные аллели отмечены звездочкой. В качестве внешней группы взята нуклеотидная последовательность ITS2 клеща *I. tanuki* (D88886).

Молекулярно-генетический анализ популяций клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* в зоне их симпатрии на территории Эстонии позволил выявить существование гибридов данных видов. Ранее на основе морфологических признаков было предположено, что около 7% (с вероятностью 95%) личинок клещей в зоне симпатрии *I. ricinus* и *I. persulcatus* являются гибридами [100]. Полученные нами данные показали, что доля гибридных особей с разным уровнем интрогрессии яДНК достигает 11%, причем среди них встречаются как нимфы, так и взрослые особи обоих полов (личинки в данной работе не исследовались). Эти данные свидетельствуют о несостоятельности представлений о полной репродуктивной изоляции между этими видами, которая проявлялась в стерильности экспериментально полученных гибридов первого поколения [5].

К сожалению, в данной работе мы затруднились определить точное соотношение аллелей ITS2 в гибридных особях, т.е. выявить гибриды F1 и беккроссы с разным уровнем интрогрессии ядерной ДНК, как было сделано для видов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*. Это связано с тем, что при анализе искусственных смесей аллелей двух видов (ПЦР-РВ) в разных соотношениях кинетика накопления флуоресценции была непропорциональна количеству исходной матрицы. Для преодоления этой проблемы необходима проверка и доработка разработанной системы на экспериментально полученных гибридах первого поколения и потомках возвратных скрещиваний с родительскими видами.

Для определения направления гибридизации (определения вида материнской особи) были проанализированы соотношения гибридов с мтДНК разных видов. Так, мтДНК *I. ricinus* у выявленных межвидовых

гибридов детектировалась в восемь раз чаще, чем *I. persulcatus*, что позволяет предположить более высокую эффективность гибридизации пар ♀ *I. ricinus* x ♂ *I. persulcatus* и ♀ *I. ricinus* x ♂ гибрид (табл. 4.8). Таким образом, в исследуемой симпатрической популяции клещей из Эстонии гибридизация между видами может проходить в обоих направлениях, но, по всей видимости, с существенной разницей по эффективности, т.е. асимметрична. У близкородственных видов клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в зоне их симпатрии также была отмечена асимметрия, однако она была менее выражена: доля гибридов с мтДНК *I. pavlovskyi* была лишь в 2.3 раза выше по сравнению с *I. persulcatus* (раздел 4.4.1). Важно отметить, что гибридизация у обоих пар клещей проходит эффективнее в том случае, если самки принадлежат видам *I. ricinus* и *I. pavlovskyi*, а самцы - *I. persulcatus* (или являются гибридными особями). Выраженность асимметрии гибридизации у этих пар клещей, по всей вероятности, определяется степенью их филогенетического родства: чем ближе родство, тем меньше препятствий для гибридизации. Так, *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* являются наиболее близкими видами, тогда как *I. ricinus* филогенетически ближе к североамериканским видам клещей *I. scapularis* и *I. pacificus* (рис. 4.17) [139, 298].

Известно, что у большинства видов животных мтДНК наследуется по материнской линии, однако у 5 гибридов (чуть более 16%) нами была обнаружена гетероплазмия, т.е. одновременное наличие у этих особей мтДНК обоих видов, что было подтверждено секвенированием (*cytb*). Явление наследования мтДНК самцов в редких случаях показано для некоторых видов насекомых, в частности для *Drosophila* sp. [197]. Можно предположить, что и у клещей в отдельных случаях может происходить

наследование отцовской мтДНК. Данный феномен нуждается в дальнейшем подтверждении и изучении.

Хотя высокий процент гибридных особей в изученных популяциях предполагал существование особей с интрогрессией мтДНК (по аналогии с парой *I. persulcatus* – *I. pavlovskyi*), в нашем исследовании они не были обнаружены. Вероятно, это является следствием выраженной асимметрии гибридизации этих видов и преимущественными возвратными скрещиваниями гибридов с родительским видом *I. ricinus*. Возможно, при исследовании больших выборок клещей в зоне симпатрии этих видов случаи интрогрессии мтДНК могут быть обнаружены, однако в любом случае их встречаемость значительно ниже, чем в случае близкородственных видов *I. persulcatus* - *I. pavlovskyi* (около 5%).

Считаем необходимым отметить, что существование гибридных популяций в зоне симпатрии клещей *I. ricinus* и *I. persulcatus* может иметь большой практический и теоретический интерес с точки зрения влияния гибридов на особенности распространения переносимых ими патогенов, а также на процессы ко-эволюции этих патогенов и их членистоногих хозяев. Так, в недавно предложенной гипотезе квантового видообразования ВКЭ межвидовым гибридам этих клещей отводится роль посредника при смене вирусом членистоногого хозяина в процессе эволюции. Согласно этой гипотезе, европейский субтип ВКЭ возник непосредственно из ВКЭ сибирского субтипа путем образования промежуточных вариантов ВКЭ с низкой приспособленностью в межвидовых гибридах.

Данные, полученные в настоящей работе, позволяют рассматривать явление гибридизации близкородственных видов иксодовых клещей как

явление, широко распространенное в областях их симпатрии. Масштабы этого явления еще предстоит изучить. Однако, необходимо отметить, что важнейшие признаки гибридных популяций в зоне симпатрии (асимметрия гибридизации, жизнеспособность и соотношение полов у гибридов, направленность интрогрессии яДНК и т.д.) в каждом конкретном случае имеют уникальные особенности, которые напрямую зависят от степени эволюционного родства родительских видов.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Естественная классификация в биологии является основополагающим методологическим приемом, позволяющим на основе выявления существенного сходства и различия между объектами живой природы познавать их эволюцию. Классификация вирусов на уровне семейств и родов в настоящее время достаточно хорошо разработана. Однако на уровне видов, генотипов и отдельных популяций она представлена слабо, либо вообще отсутствует.

Выделение в составе отдельных субтипов ВКЭ групп филогеографически связанных между собой штаммов – кластеронов – дает уникальную возможность исследователям по-новому взглянуть на процессы происхождения, распространения и эволюции ВКЭ. Так, например, любая популяция ВКЭ может быть представлена как совокупность кластеронов и быть выражена в виде кластеронной структуры. Изменение кластеронной структуры по таким параметрам, как численность штаммов в кластероне, изменение кластеронного состава, выявление особенностей территориального распределения кластеронов, а также оценка их возраста и др., является методологической основой для эффективного мониторинга и позволяет выявлять особенности и механизмы формирования и поддержания природных очагов КЭ.

Существующие представления об эволюции ВКЭ во многом противоречивы, что сильно затрудняет наше понимание фундаментальных закономерностей появления (возникновения) клещевых флавивирусов и их коэволюции с членистоногими хозяевами. Предложенный в настоящей работе кластеронный подход для вирусных популяций в совокупности с теорией квазивидов, а также теорией

квантовой эволюции позволяет переосмыслить «старую» проблему и перевести исследования КЭ на новый уровень.

Разработанная нами концепция происхождения, распространения и эволюции ВКЭ является попыткой такого переосмысления. Главным ее достоинством является то, что она дает развернутые и конкретные ответы на самые «неудобные» вопросы, связанные с эволюцией ВКЭ. Также сильной стороной предлагаемой концепции является ее предсказательная сила, позволяющая предполагать существование еще неизвестных феноменов, связанных с эволюцией ВКЭ. Так, например, необходимость промежуточного хозяина для формирования новых генетических вариантов вируса (например, ВКЭ-Ев из ВКЭ-Сиб) в ходе квантовой эволюции позволила предсказать существование межвидовых гибридов близкородственных видов иксодовых клещей в природных популяциях, что и было нами показано на примере двух пар видов клещей.

Предлагаемая концепция дает возможность детально реконструировать эволюционную историю ВКЭ как во времени, так и пространстве. Данные, полученные в результате такой реконструкции, однозначно указывают на то, что основным фактором распространения ВКЭ на территории Евразии является экономическая деятельность человека. При этом формы и масштабы такой деятельности могут быть различными, будь то освоение Западной Сибири в отдаленном прошлом, акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в прошлом веке или строительство дорог в настоящее время. Учет антропогенного фактора может кардинально повлиять на систему мероприятий по профилактике и борьбе с КЭ в будущем.

Изучение вопросов эволюции, а также установление региональных особенностей распределения генетических вариантов ВКЭ и других

флавивирусов невозможны без выявления и исключения случаев кросс-контаминации и (или) лабораторной ошибки при работе со штаммами вируса. Работа по установлению подлинности одного из трех штаммов *Soffin* показала, что такие ошибки происходят достаточно часто и могут приводить к серьезным последствиям. Отсутствие критериев выявления таких ошибок и критического отношения к работе вирусологических лабораторий может ввести в заблуждение исследователей и привести к неправильной интерпретации полученных результатов.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что распространение ВКЭ по территории Сибири, Урала и Северо-Запада России проходило по транспортным путям: Первой сухопутной дороге в Сибирь и Транссибирской дороге во времена колонизации Сибири;
2. Выдвинуто предположение о том, что распространение штаммов ВКЭ на неэндемичных территориях может быть связано с реализацией долгосрочных государственных программ по Акклиматизации охотничье-промысловых зверей и птиц;
3. Показана возможность объединения штаммов ВКЭ в группы (кластероны) по признаку идентичности аминокислотных последовательностей фрагмента гликопротеина Е и типу территориального распределения;
4. На основе кластеронного подхода предложена классификация ВКЭ в пределах субтипа; исследованы вопросы происхождения, распространения и эволюции вируса, а также разработаны теоретические принципы перманентного мониторинга вирусных популяций на разных территориальных уровнях;
5. Показана ошибочность представлений о высокой генетической изменчивости популяций *I. persulcatus* таежной зоны России на уровне генов рРНК, что указывает на непригодность данных генетических маркеров для выявления генетически различных популяций клещей и изучения процессов формирования их коэволюционных связей с ВКЭ;
6. Дано обоснование необходимости обязательной генетической паспортизации коллекционных и вакцинных штаммов ВКЭ для выявления и учета кросс-контаминаций и (или) лабораторных ошибок;

7. Разработана концепция квантовой эволюции ВКЭ, в основе которой лежит представление о быстрой перестройке вирусного генома в результате смены вирусом основного хозяина (клеща);

8. Открыт феномен межвидовой гибридизации близкородственных видов иксодовых клещей в зонах их симпатрии, выдвинута гипотеза о широком распространении этого явления среди клещей комплекса *I. ricinus*.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность руководству ФГАОУ ВПО УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина в лице проректора по науке В.В. Кружаева, почетного президента университета член-корреспондента РАН, проф. В.Е. Третьякова и проф. Н.Н. Фирсова за помощь в организации Лаборатории молекулярной генетики и предоставленную возможность выполнения данной работы. Я благодарен Российскому Фонду Фундаментальных Исследований, а также Правительству Свердловской области за финансирование региональных грантов РФФИ - «Урал» №№ 07-04-96115, 10-04-96062 и 13-04-96045, выполненных по теме диссертации. Я признателен заместителю главного врача д.м.н. В.В. Романенко, а также сотрудникам вирусологической лаборатории и ее заведующей к.б.н. Т.Э. Снитковской ФБУЗ «Центра гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» за активную помощь в настоящей работе. Большую теоретическую и практическую помощь оказал заведующий лабораторией арбовирусных инфекций ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» д.м.н., проф. В.С. Кокорев. Также благодарю к.б.н., доц. В.Л. Умпелева, Б.А. Галишева, Т.А. Пименову, к.б.н. Е.Г. Филиппова, к.б.н. П.В. Куликова, д.б.н. проф. Н.К. Токаревича, д.б.н. Л.Б. Козлова, Ш.И. Ибрагимова, Н.В. Логиновских, к.б.н. О.Л. Бурундукову и всех тех, кто по мере сил и возможностей принял участие в сборе полевого материала, а также в обсуждении результатов работы. Я благодарен официальным оппонентам за внимательное прочтение работы и ценные замечания. Я благодарен всем соавторам моих работ, не упомянутым выше, за помощь в проведении данных исследований. Особенно я признателен моему аспиранту Т.А. Мухачевой за неоценимую помощь в работе, терпение и поддержку.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адельшин, Р. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита в европейской части России и некоторых странах Балтии, Восточной и Юго-Восточной Европы / Р. Адельшин, В. Злобин, С. Беликов, Ю. Джигоев, Т. Демина, М. Газо, И. Козлова, М. Верховина, В. Вотяков, Л. Титов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2006. – № 2. – С. 27-34.
2. Айала, Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику/ Ф. Айала // М.: Мир, 1984. 232 с.
3. Алексеев, А. Н. Система клещ-возбудитель и ее эмерджентные свойства/ А. Н. Алексеев// Спб.: Зоол. Инст. РАН, 1993. - 205 с.
4. Андаев, Е. И. Изоляция и молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита от иксодовых клещей с острова Русский (Приморский край) / Е. И. Андаев, Т. И. Борисова, Е. А. Сидорова, Р. В. Адельшин, А. Я. Никитин, С. В. Балахонов // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 93-97.
5. Балашов, Ю. С. Репродуктивная изоляция и межвидовая гибридизация иксодовых клещей группы *Ixodes ricinus* - *persulcatus* (acarina, ixodidae) / Ю. С. Балашов, Л. А. Григорьева, Д. Оливер // Энтомологическое обозрение. – 1998. – Т. 77. – № 3. – С. 713-721.
6. Беликов, С. И. Генотипирование вируса клещевого энцефалита / С. И. Беликов, Т. В. Бутина, Т. В. Демина, В. И. Злобин // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2002. – Т. 2. – № 4. – С. 36-39.
7. Беликов, С. И. Молекулярно-генетическая характеристика и эволюция вирусов комплекса клещевого энцефалита в Дальневосточном природном очаге / С. И. Беликов, И. Г. Кондратов,

- Г. Н. Леонова // Национальные приоритеты России. – 2014. – № 3 (13). – С. 96-99.
8. Вотяков, В. Клещевые энцефалиты Евразии/ В. Вотяков, В. Злобин, Н. Мишаева // Новосибирск: Наука - 2002. - 438 с.
  9. Вотяков, В. И. Западный клещевой энцефалит/ В. И. Вотяков, И. И. Протас, В. М. Жданов // Минск: Беларусь. - 1978. - 256 с.
  10. Герасимов, С. Г. Взаимодействие сибирского и дальневосточного подтипов вируса клещевого энцефалита при микстинфекции в организме млекопитающих. Конкуренция подтипов при острой и инapparантной инфекции / С. Г. Герасимов, В. В. Погодина, Н. М. Колясникова, Л. С. Карань, Г. В. Маленко, Л. С. Левина // Вопр. Вирусол. – 2011. – № 3. – С. 41-44.
  11. Грант, В. Эволюция организмов/ В. Грант // М.: Мир. - 1980. - 470 с.
  12. Гущин, А. Е. Разработка набора реагентов "Амплисенс HCV-генотип" для определения субтипов 1a, 1b, 2a, 3a вируса гепатита В / А. Е. Гущин, О. М. Носкова, Г. А. Шипулин // Вопр. вирусол. – 2003. – № 3. – С. 45-48.
  13. Демина, Т. В. Генетическая вариабельность и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксиолигонуклеотидных зондов. / Т. В. Демина, Ю. П. Джигоев, М. М. Верховина, И. В. Козлова, С. Е. Ткачев, Е. К. Дорощенко, О. В. Лисак, В. И. Злобин // Вопр. вирусол. – 2009. – № 3. – С. 33-42.
  14. Демина, Т. В. Молекулярная эпидемиология вируса клещевого энцефалита: географическая вариабельность, определяемая методом молекулярной гибридизации / Т. В. Демина, Ю. П. Джигоев, М. М. Верховина, И. В. Козлова, С. Е. Ткачев, Е. К. Дорощенко, О. В.



- Лисак, В. И. Злобин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009. – Т. 3 (46). – № 3. – С. 27-39.
15. Демина, Т. В. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования / Т. В. Демина, Ю. П. Джигоев, И. В. Козлова, М. М. Верховина, С. Е. Ткачев, Е. К. Дорощенко, О. В. Лисак, А. И. Парамонов, В. И. Злобин // Вопр. вирусол. – 2012. – № 4. – С. 12-19.
  16. Джигоев, Ю. П. Обнаружение рекомбинаций у вируса клещевого энцефалита с помощью компьютерного анализа вирусных геномов / Ю. П. Джигоев, А. И. Парамонов, Т. В. Демина, И. В. Козлова, М. М. Верховина, С. Е. Ткачев, А. А. Приставка, В. П. Саловарова, В. И. Злобин // Вопр. Вирусол. – 2011. – Т. 56. – С. 14-18.
  17. Добрикова, Е. Обнаружение вируса клещевого энцефалита в крови людей и в индивидуальных клещах методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот / Е. Добрикова, А. Плетнев, В. Шаманин // Вопр. вирусол. – 1986. – Т. 6. – С. 739-742.
  18. Дубов, А. В. История выделения естественно ослабленного штамма Еланцев вируса клещевого энцефалита/ А. В. Дубов // Тюмень: Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии. - 1969. - С. 8-15
  19. Дубов, А. В. Опыт применения живой вакцины против клещевого энцефалита/ А. В. Дубов // Тюмень: НИИКИП. - 1971. - 155 с.
  20. Дулицкий, А. Результаты акклиматизации млекопитающих в Крыму / А. Дулицкий, В. Кормилицина // Охота, пушнина и дичь: Сборник научно-технической информации ВНИИОЗ.–Киров: Волго-Вятское книжное изд-во, Кировское отделение. – 1975. – № 47-48. – С. 58-66.

21. В. М. Жданов. Вирусы трансмиссивных лихорадок и энцефалитов/ В.М. Жданов // Определитель вирусов человека и животных – М, 1953. – С. 111-128.
22. Зильбер, Л. А. Весенний (весенне-летний) эндемический клещевой энцефалит / Л. А. Зильбер // Арх. биол. наук. – 1939. – Т. 56. – № вып.2. – С. 9-37.
23. Зильбер, Л. А. Эпидемические энцефалиты/ Л. А. Зильбер // М.: - Медгиз.- 1945. - 252 с.
24. Злобин, В. Новая концепция природной генетической variability вируса клещевого энцефалита / В. Злобин, С. Беликов, Ю. Джигоев, Т. Демина, И. Козлова, М. Верховина, Н. Кулакова // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2001. – Т. 7. – № 2. – С. 75-78.
25. Злобин, В. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита / В. Злобин, М. Верховина, Т. Демина, Ю. Джигоев, Р. Адельшин, И. Козлова, С. Беликов, М. Хаснатинов, Г. Данчинова, Е. Исаева // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52. – № 6. – С. 4-13.
26. Злобин, В. И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики / В. И. Злобин // Терра Медика Нова. – 2010. – № 2. – С. 13-21.
27. Злобин, В. И. Итоги молекулярно-эпидемиологических исследований клещевого энцефалита в институте эпидемиологии и микробиологии НЦ МЭ ВСНЦ (1988-2002) / В. И. Злобин, С. И. Беликов, Л. В. Мамаев, О. З. Горин, Ю. П. Джигоев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2002. – Т. 2. – № 4. – С. 9-13.

28. Злобин, В. И. Молекулярные зонды для генетического типирования вируса клещевого энцефалита / В. И. Злобин, М. Х. Газо, С. И. Беликов, Ю. П. Джигоев, Т. В. Демина, М. М. Верховина, И. В. Козлова, Р. В. Адельшин, Е. К. Дорощенко // *Вопр. вирусол.* – 2001. – № 4. – С. 43-47.
29. Злобин, В. И. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа уровней гомологии фрагмента гена белка оболочки Е / В. И. Злобин, Т. В. Демина, С. И. Беликов // *Вопр. Вирусол.* – 2001. – Т. 46. – № 1. – С. 17-22.
30. Злобин, В. И. Анализ генетической вариабельности штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е / В. И. Злобин, Т. В. Демина, Т. В. Бутина // *Вопр. Вирусол.* – 2001. – Т. 46. – № 1. – С. 12-16.
31. Карань, Л. Развитие методов детекции и генотипирования вируса клещевого энцефалита на основе амплификационных технологий / Л. Карань, С. Браславская, А. Мязин // *Вопросы вирусологии.* – 2007. – Т. 52. – № 6. – С. 17-22.
32. Карань, Л. Генетические различия восточноевропейской и азиатской популяций вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа / Л. Карань, В. Погодина, Т. Фролова, А. Платонов // *Бюлл. сиб. мед.* – 2006. – № 5. – С. 24-27.
33. Карань, Л. С. Применение молекулярно-генетических методик для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита / Л. С. Карань, Г. В. Маленко, Н. Г. Бочкова, Л. С. Левина, Г. П. Пиванова, Н. М. Колясникова, Е. Г. Гамов, А. Г. Трухина, В. И. Злобин, М. М. Верховина, К. И.В., Ю. П. Джигоев, Т. В. Демина, В. В. Погодина // *Бюллетень СО РАМН.* – 2007. – Т. 4(126). – С. 34-40.

34. Карань, Л. С. Изучение распространенности возбудителей ряда инфекций, передаваемых клещами, собранными в разных ландшафтных зонах Свердловской области / Л. С. Карань, А. Е. Мязин, Н. Г. Бочкова, Г. В. Маленко, Л. С. Левина, В. В. Романенко, О. Г. Прохорова, М. С. Карякина, В. В. Погодина А.Е. Платонов // Томск. - 2006. – С. 61-62.
35. Карань, Л. С. Определение генотипа вируса клещевого энцефалита с использованием метода анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов / Л. С. Карань, В. В. Погодина, Н. Г. Бочкова, Г. В. Маленко, Л. С. Левина, Т. В. Фролова, А. Е. Мязин, А. Е. Платонов // Всероссийская научно-практическая конференция «Генодиагностика инфекционных болезней». Т. II. Раздел 6. – М. - 2004. – С. 177-179.
36. Карань, Л. С. Генетические различия восточно-европейской азиатской популяции вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа / Л. С. Карань, В. В. Погодина, Т. В. Фролова, А. Е. Платонов // Бюлл сиб мед. – 2006. – № 5. – С. 24-27.
37. Козлова, И. В. Молекулярная эпидемиология и генетическая характеристика урало-сибирского генотипа вируса клещевого энцефалита / И. В. Козлова, В. И. Злобин, М. М. Верховина, Т. В. Демина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2002. – Т. 2. – № 4. – С. 70-73.
38. Колясникова, Н. М. Мониторинг структуры популяций вируса клещевого энцефалита в Уральском, Западно-Сибирском и Северо-Западном регионах России/ Н. М. Колясникова // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - М., 2008.

39. Коренберг, Э. Мелкие млекопитающие и проблема природной очаговости клещевого энцефалита / Э. Коренберг // Биол. журн. – 1979. – Т. 58. – № 4. – С. 242-252.
40. Кулакова, Н. Определение генотипа штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от больных людей с различной степенью тяжести инфекции на территории юга Дальнего Востока России / Н. Кулакова, С. Беликов, Г. Леонова // Клещевой энцефалит. – 2002. – С. 60-71.
41. Кулакова, Н. Разработка способа экспресс-генотипирования штаммов вируса клещевого энцефалита с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов / Н. Кулакова, С. Беликов, Г. Леонова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2007. – № 4. – С. 29-33.
42. Кучерук, В. Клещевой энцефалит. В: География природноочаговых болезней человека в связи с задачами их профилактики.(ред. ПА Петрищева, НГ Олсуфьев) с. 171-216 / В. Кучерук, Л. Иванова, В. Неронов // М.: Медицина, – 1969. – С. 171-216
43. Локтев, В. Б. Вирус клещевого энцефалита. Генетические особенности и его изменчивость в современном мире / В. Б. Локтев // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – № 4 (126). – С. 14-21.
44. Л. Н. Мазур. «Исчезающая» деревня: сселение неперспективных деревень в Свердловской области в 1970-1980-е гг. / Села и деревни Среднего Урала в XX веке: статистико-этнографическое описание // Екатеринбург : УрГУ. - 2003. – 160 с.
45. Майр, Э. Популяции, виды и эволюция / Э. Майр // М.: Мир. – 1974. – 461 с.

46. Г. Г. Онищенко. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 12 мая 2011 г. № 53 г. Москва "Об усовершенствовании эпидемиологического надзора и профилактических мероприятий в отношении клещевого вирусного энцефалита" / "РГ" - Федеральный выпуск №5498 от 8 июня 2011 г., 2011.
47. Онищенко, Г. Г. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации / Г. Г. Онищенко, Ю. М. Федоров, Н. Д. Пакскина // Вопр. Вирусол. – 2007. – Т. 52. – № 5. – С. 8-10.
48. Павлов, М. П. Акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в СССР. Часть 4/ М. П. Павлов // Москва-Киров. - 1996. - 293 с.
49. Павлов, М. П. Акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в СССР. Часть 3/ М. П. Павлов // Киров. - 1999. - 666 с.
50. Павлов, М. П. Акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в СССР. Часть 2/ М. П. Павлов, И. В. Корсакова, Н. П. Лавров // Киров: Волго-Вятское. - 1974. - 485 с.
51. Павлов, М. П. Акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в СССР. Часть 1/ М. П. Павлов, И. В. Корсакова, Е. В. Тимофеев, В. Г. Сафонов - Киров: Волго-Вятское, 1973. - 535 с.
52. Плетнев, А. Г. Нуклеотидная последовательность генома и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса клещевого энцефалита / А. Г. Плетнев, В. Ф. Ямщиков, В. М. Блинов // Биорган. химия. – 1989. – Т. 15. – № 11. – С. 1504-1521.
53. Погодина, В. В. Мониторинг популяций вируса клещевого энцефалита и этиологической структуры заболеваемости за 60-

- летний период / В. В. Погодина // Вопр. вирусол. – 2005. – Т. 3. – С. 7-13.
54. Погодина, В. В. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя / В. В. Погодина, С. В. Карань, Л. С. Колясникова, Л. С. Левина, Г. В. Маленко, Е. Г. Гамова, М. В. Лесникова, А. С. Килячина, М. С. Есюнина, Н. Г. Бочкова, Т. А. Шопенская, Т. В. Фролова, Е. И. Андаев, А. Г. Трухина // Вопр. Вирусол. – 2007. – Т. 5. – С. 16-21.
  55. Погодина, В. В. Преобразование популяций вируса клещевого энцефалита в условиях антропогенной трансформации природных очагов / В. В. Погодина, Н. М. Колясникова // Медицинская вирусология. - Т. XXV. - 2008. – С. 103-114.
  56. Субботина, Е. Л. Молекулярная эволюция вируса клещевого энцефалита и вируса повассан / Е. Л. Субботина, В. Б. Локтев // Молекул. биол. – 2012. – Т. 46. – № 1. – С. 82-92.
  57. Сухомлинова, О. К экологии иксодовых клещей мелких млекопитающих Ленинградской области / О. Сухомлинова // Паразитология. – 1977. – Т. 11. – № 5. – С. 436-441.
  58. Ткачев, С. Е. Характеристика штаммов вируса клещевого энцефалита европейского генотипа, выявленных на территории Западной и Восточной Сибири / С. Е. Ткачев, И. В. Козлова, Ю. П. Джигоев, М. М. Верхозина, Е. К. Дорощенко, О. В. Лисак, Т. В. Демина, О. В. Сунцова, В. И. Злобин, А. И. Парамонов, А. Ю. Тикунов, А. В. Ляпунов, Н. В. Тикунова, Д. Ружек // Национальные приоритеты России. – 2014. – № 3. – С. 127-130.

59. Ткаченко, А. А. Акклиматизация млекопитающих в КГЗОХ. Крымское гос. заповедн.-охот. хоз-во, 50 лет / А. А. Ткаченко // Симферополь: Крымиздат, 1963. с.?
60. Тюлько, Ж. С. Вариабельность нуклеотидных последовательностей геномов вируса клещевого энцефалита, связанная с их структурой / Ж. С. Тюлько, В. В. Якименко // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 27-30.
61. Ушакова, Г. О видах группы *Ixodes persulcatus* (Parasitiformes, Ixodidae). II. К экологии *Ixodes pavlovskyi* Rom. в Восточном Казахстане / Г. Ушакова, Н. Филиппова // Паразитология. – 1968. – Т. 2. – № 4. – С. 334-338.
62. Ушакова, Г. О видах группы *Ixodes persulcatus* (Parasitiformes, Ixodidae). IV. Новые данные по экологии *Ixodes pavlovskyi* в Восточном Казахстане / Г. Ушакова, Н. Филиппова, И. Панова // Паразитология. – 1969. – Т. 3. – № 5. – С. 436-439.
63. Филиппова, Н. О видах группы *Ixodes persulcatus* (Parasitiformes, Ixodidae). VII. Палеогенез южной ветви группы *Ixodes persulcatus* и взаимоотношения с *I. ricinus* (L.) / Н. Филиппова // Паразитология. – 1973. – Т. 7. – № 1. – С. 3-13.
64. Филиппова, Н. Иксовые клещи подсем. Ixodinae / Н. Филиппова // Фауна СССР. Паукообразные. Л. – 1977. – Т. 4. – № 4. – С. 396.
65. Филиппова Н. А. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae): Морфология, систематика, экология, медицинское значение/ Н. А. Филиппова // Л.: Наука. - 1985. - 352 с.



66. Филиппова, Н. А. Особенности рангов род и подрод и интеркалярное объединение групп видов у иксодовых клещей (Acari, Ixodidae) / Н. А. Филиппова // Паразитология. – 2008. – Т. 42. – № 4. – С. 249-263.
67. Филиппова, Н. А. Симпатрия близкородственных видов иксодовых клещей и ее возможная роль в паразитарных системах природных очагов трансмиссивных болезней / Н. А. Филиппова // Паразитология. – 1999. – Т. 33. – № 3. – С. 223-241.
68. Филиппова, Н. А. Многоступенчатый механизм репродуктивной изоляции близкородственных видов *Ixodes persulcatus* и *I. pavlovskyi* (Ixodidae) в области симпатрии / Н. А. Филиппова // Паразитология. – 2001. – Т. 35. – № 5. – С. 361-375.
69. Филиппова, Н. А. Место морфологического барьера в механизмах репродуктивной изоляции, действующих в областях симпатрии близкородственных видов *Ixodes persulcatus*–*I. pavlovskyi* и *I. persulcatus*–*I. ricinus* (Ixodidae) / Н. А. Филиппова // Паразитология. – 2002. – Т. 36. – № 6. – С. 457-468.
70. Цилинский, Я. Я. Популяционная структура и эволюция вирусов/ Я. Цилинский // М.: Медицина. - 1988. - 240 с.
71. Чаусов, Е. В. Генетическое разнообразие инфекционных агентов, переносимых иксодовыми клещами в г. Томске и его пригородах / Е. В. Чаусов, В. А. Терновой, Е. В. Протопопова, С. Н. Коновалова, Ю. В. Кононова, Н. Л. Першикова, Н. С. Москвитина, В. Н. Романенко, Н. В. Иванова, Н. П. Большакова // Паразитология. – 2009. – Т. 43. – № 5. – С. 374-388.
72. Чумаков, М. П. Клещевой энцефалит человека / М. П. Чумаков // Дисс. докт. мед. наук. М. – 1944.

73. Чумаков, М. П. Три антигенных типа вируса клещевого энцефалита, их зависимость от основных видов клещей переносчиков и географическое распространение / М. П. Чумаков, С. Г. Рубин, М. Б. Линев // Вопросы медицинской вирусологии. – 1975. – С. 371-372.
74. Шелкова, Е. С. Клинико-эпидемиологические особенности клещевого энцефалита в Свердловской области в периоде массовой иммунизации / Е. С. Шелкова, О. П. Ковтун, В. В. Романенко // Неврологический вестник. – 2007. – Т. 39. – № 1. – С. 75-79.
75. Юрченко, О. А. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита в Крыму / О. А. Юрченко, Н. А. Виноград, Д. А. Дубина // Вопр. Вирусол. – 2012. – Т. 57. – № 3. – С. 40-43.
76. Юрченко, О. А. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита циркулирующего в Северо-западном Причерноморье / О. А. Юрченко, Д. А. Дубина, Н. А. Виноград // Микробиология и биотехнология. – 2013. – № 1. – С. 20-28.
77. Aaskov, J. Multiple recombinant dengue type 1 viruses in an isolate from a dengue patient / J. Aaskov, K. Buzacott, E. Field, K. Lowry, A. Berlioz-Arthaud, E. C. Holmes // The Journal of general virology. – 2007. – Vol. 88. – № Pt 12. – P. 3334-3340.
78. Aaskov, J. Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and Aedes mosquitoes / J. Aaskov, K. Buzacott, H. M. Thu, K. Lowry, E. C. Holmes // Science. – 2006. – Vol. 311. – № 5758. – P. 236-238.
79. AbuBakar, S. Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia / S. AbuBakar, P. F. Wong, Y. F. Chan // The Journal of general virology. – 2002. – Vol. 83. – № Pt 10. – P. 2437-2442.

80. Achazi, K. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing / K. Achazi, A. Nitsche, P. Patel, A. Radonić, O. D. Mantke, M. Niedrig // *Journal of virological methods*. – 2011. – Vol. 171. – № 1. – P. 34-39.
81. Allison, S. L. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E / S. L. Allison, J. Schlich, K. Stiasny, C. W. Mandl, F. X. Heinz // *J Virol*. – 2001. – Vol. 75. – № 9. – P. 4268-4275.
82. Anstead, C. A. An assessment of genetic differences among ixodid ticks in a locus within the nuclear large subunit ribosomal RNA gene / C. A. Anstead, C. N. Krakowetz, A. S. Mann, K. A. Sim, N. B. Chilton // *Mol Cell Probes*. – 2011. – Vol. 25. – № 5-6. – P. 243-248.
83. Appel, N. Efficient rescue of hepatitis C virus RNA replication by trans-complementation with nonstructural protein 5A / N. Appel, U. Herian, R. Bartenschlager // *Journal of virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 2. – P. 896-909.
84. Araya-Anchetta, A. Hybridization in natural sympatric populations of *Dermacentor* ticks in northwestern North America / A. Araya-Anchetta, G. Scoles, J. Giles, J. Busch, D. Wagner // *Ecology and evolution*. – 2013. – Vol. 3. – № 3. – P. 714-724.
85. Bae, C. Molecular Analysis of the Lance Nematode, *Hoplolaimus* spp., Using the First Internal Transcribed Spacer and the D1-D3 Expansion Segments of 28S Ribosomal DNA1 / C. Bae, A. Szalanski, R. Robbins // *J Nematol*. – 2008. – Vol. 40. – № 3. – P. 201-209.
86. Bakhvalova, V. N. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia /

- V. N. Bakhvalova, A. K. Dobrotvorsky, V. V. Panov, V. A. Matveeva, S. E. Tkachev, O. V. Morozova // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2006. – Vol. 6. – № 1. – P. 32-41.
87. Bakhvalova, V. N. Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents / V. N. Bakhvalova, O. F. Potapova, V. V. Panov, O. V. Morozova // *Virus Res.* – 2009. – Vol. 140. – № 1-2. – P. 172-178.
  88. Bandelt, H. J. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies / H. J. Bandelt, P. Forster, A. Rohl // *Mol Biol Evol.* – 1999. – Vol. 16. – № 1. – P. 37-48.
  89. Baranowski, E. Evolution of cell recognition by viruses / E. Baranowski, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Domingo // *Science.* – 2001. – Vol. 292. – № 5519. – P. 1102-1105.
  90. Baranowski, E. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage / E. Baranowski, C. M. Ruiz-Jarabo, N. Sevilla, D. Andreu, E. Beck, E. Domingo // *Journal of virology.* – 2000. – Vol. 74. – № 4. – P. 1641-1647.
  91. Barton, N. H. The role of hybridization in evolution / N. H. Barton // *Mol Ecol.* – 2001. – Vol. 10. – № 3. – P. 551-568.
  92. Beati, L. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters / L. Beati, J. E. Keirans // *J Parasitol.* – 2001. – Vol. 87. – № 1. – P. 32-48.
  93. Benda, R. The common tick *Ixodes ricinus* L. as a reservoir and vector of tick-borne encephalitis. I. Survival of the virus (strain B3) during the

- development of the tick under laboratory conditions / R. Benda // J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. – 1958. – Vol. 2. – P. 314-330.
94. Benda, R. The common tick *Ixodes ricinus* L. as a reservoir and vector of tick-borne encephalitis. II. Experimental transmission of encephalitis to laboratory animals by ticks at various stages of development / R. Benda // J. Hyg. Epidem.(Praha). – 1958. – Vol. 2. – P. 331-344.
  95. Bertrand, Y. First dating of a recombination event in Mammalian tick-borne flaviviruses / Y. Bertrand, M. Topel, A. Elvang, W. Melik, M. Johansson // PloS one. – 2012. – Vol. 7. – № 2. – P. e31981.
  96. Bhardwaj, S. Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein / S. Bhardwaj, M. Holbrook, R. Shope, A. Barrett, S. Watowich // Journal of virology. – 2001. – Vol. 75. – № 8. – P. 4002-4007.
  97. C. K. Biebricher, M. Eigen. What is a quasispecies? // Quasispecies: Concept and implications for virology : Springer, 2006. – C. 1-31.
  98. Blancou, J. Transmission du virus de la rage: importance de la barrière d'espèce. Discussion / J. Blancou, M. Aubert, G. Blancher, R. Nordmann, A. Rerat, C. Laroche // Bulletin de l'Académie nationale de médecine. – 1997. – Vol. 181. – № 2. – P. 301-312.
  99. Buckler, E. S. t. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications / E. S. t. Buckler, A. Ippolito, T. P. Holtsford // Genetics. – 1997. – Vol. 145. – № 3. – P. 821-832.
  100. Bugmyrin, S. V. Morphological differentiation of *Ixodes persulcatus* and *I. ricinus* hybrid larvae in experiment and under natural conditions / S. V. Bugmyrin, O. A. Belova, E. P. Ieshko, L. A. Bespyatova, G. G. Karganova // Ticks and Tick Borne Diseases. – 2015. – Vol. 6. – № 2. – P. 129-133.

101. Casati, S. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae) / S. Casati, M. V. Bernasconi, L. Gern, J. C. Piffaretti // *Infect Genet Evol.* – 2008. – Vol. 8. – № 2. – P. 152-158.
102. Chambers, T. J. Flavivirus genome organization, expression, and replication / T. J. Chambers, C. S. Hahn, R. Galler, C. M. Rice // *Annu Rev Microbiol.* – 1990. – Vol. 44. – P. 649-688.
103. Chao, L.-L. Prevalence and molecular identification of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes granulatus* ticks collected from *Rattus losea* on Kinmen Island of Taiwan / L.-L. Chao, L.-L. Liu, C.-M. Shih // *Parasites & vectors.* – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 1-9.
104. Chao, L. Levels of selection, evolution of sex in RNA viruses, and the origin of life / L. Chao // *Journal of theoretical biology.* – 1991. – Vol. 153. – № 2. – P. 229-246.
105. Chausov, E. V. Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in Western Siberia / E. V. Chausov, V. A. Ternovoi, E. V. Protopopova, J. V. Kononova, S. N. Konovalova, N. L. Pershikova, V. N. Romanenko, N. V. Ivanova, N. P. Bolshakova, N. S. Moskvitina, V. B. Loktev // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2010. – Vol. 10. – № 4. – P. 365-375.
106. Chen, S. P. Identification of a recombinant dengue virus type 1 with 3 recombination regions in natural populations in Guangdong province, China / S. P. Chen, M. Yu, T. Jiang, Y. Q. Deng, C. F. Qin, J. F. Han, E. D. Qin // *Arch Virol.* – 2008. – Vol. 153. – № 6. – P. 1175-1179.
107. Chi, L. Manchuria in History, a Summary, by Li Chi/ L. Chi // Peking Union Bookstore. - 1932. - 226 p.

108. Chumakov, K. M. Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine / K. M. Chumakov, L. B. Powers, K. E. Noonan, I. B. Roninson, I. S. Levenbook // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1991. – Vol. 88. – № 1. – P. 199-203.
109. M. P. Chumakov, E. N. Levkovich. Russian Spring Summer Encephalitis / The International Catalog of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates // 1985. URL: <http://wwwn.cdc.gov/arbovat/catalog-listing.asp?VirusID=404&SI=1>.
110. Clarke, D. H. Antigenic analysis of certain group B arthropod-borne viruses by antibody absorption / D. H. Clarke // The Journal of experimental medicine. – 1960. – Vol. 111. – № 1. – P. 21-32.
111. Clarke, D. H. Further Studies on Antigenic Relationships among the Viruses of the Group B Tick-Borne Complex / D. H. Clarke // Bull World Health Organ. – 1964. – Vol. 31. – P. 45-56.
112. Cook, S. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission / S. Cook, E. Holmes // Archives of virology. – 2006. – Vol. 151. – № 2. – P. 309-325.
113. Crabtree, M. B. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus / M. B. Crabtree, R. C. Sang, V. Stollar, L. M. Dunster, B. R. Miller // Arch Virol. – 2003. – Vol. 148. – № 6. – P. 1095-1118.
114. Dabert, M. DNA markers in the phylogenetics of the Acari / M. Dabert // Biological Letters – 2006. – Vol. 43. – № 2. – P. 97-107

115. Davies, T. J. Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans / T. J. Davies, A. B. Pedersen // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2008. – Vol. 275. – № 1643. – P. 1695-1701.
116. De La Torre, J. RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny / J. De La Torre, J. J. Holland // *Journal of virology*. – 1990. – Vol. 64. – № 12. – P. 6278-6281.
117. de Meeus, T. Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus* / T. de Meeus, L. Beati, C. Delaye, A. Aeschlimann, F. Renaud // *Evolution*. – 2002. – Vol. 56. – № 9. – P. 1802-1807.
118. De Rijk, P. RnaViz 2: an improved representation of RNA secondary structure / P. De Rijk, J. Wuyts, R. De Wachter // *Bioinformatics*. – 2003. – Vol. 19. – № 2. – P. 299-300.
119. Delaye, C. Population genetic structure of *Ixodes ricinus* in Switzerland from allozymic data: no evidence of divergence between nearby sites / C. Delaye, L. Beati, A. Aeschlimann, F. Renaud, T. de Meeus // *Int J Parasitol*. – 1997. – Vol. 27. – № 7. – P. 769-773.
120. Demina, T. V. Genotypes 4 and 5 of the tick-borne encephalitis virus: features of the genome structure and possible scenario for its formation / T. V. Demina, P. Dzhioev Iu, I. V. Kozlova, M. M. Verkhozina, S. E. Tkachev, E. K. Doroshchenko, O. V. Lisak, A. I. Paramonov, V. I. Zlobin // *Voprosy Virusologii*. – 2012. – Vol. 57. – № 4. – P. 13-19.
121. Demina, T. V. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes / T. V. Demina, Y. P. Dzhioev, M. M. Verkhozina, I. V. Kozlova, S. E. Tkachev, A. Plyusnin, E. K. Doroshchenko, O. V. Lisak, V. I.



- Zlobin // Journal of Medical Virology. – 2010. – Vol. 82. – № 6. – P. 965-976.
122. Domingo, E. Quasispecies theory in virology / E. Domingo // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76. – № 1. – P. 463-465.
  123. Domingo, E. Quasispecies: Concept and Implications for Virology / E. Domingo // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2006. – Vol. 299.
  124. Domingo, E. Basic concepts in RNA virus evolution / E. Domingo, C. Escarmis, N. Sevilla, A. Moya, S. F. Elena, J. Quer, I. S. Novella, J. J. Holland // The FASEB Journal. – 1996. – Vol. 10. – № 8. – P. 859-864.
  125. Domingo, E. RNA virus mutations and fitness for survival / E. Domingo, J. J. Holland // Annual Reviews in Microbiology. – 1997. – Vol. 51. – № 1. – P. 151-178.
  126. Domingo, E. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population / E. Domingo, D. Sabo, T. Taniguchi, C. Weissmann // Cell. – 1978. – Vol. 13. – № 4. – P. 735-744.
  127. Domingo, E. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population / E. Domingo, D. Sabo, T. Taniguchi, C. Weissmann // Cell. – 1978. – Vol. 13. – № 4. – P. 735-744.
  128. Drummond, A. J. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 / A. J. Drummond, M. A. Suchard, D. Xie, A. Rambaut // Molecular Biology and Evolution. – 2012. – Vol. 29. – № 8. – P. 1969-1973.
  129. Ecker, M. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia / M. Ecker, S. L. Allison, T. Meixner, F. X. Heinz // J Gen Virol. – 1999. – Vol. 80 ( Pt 1). – P. 179-185.

130. Eigen, M. A principle of natural self-organization / M. Eigen, P. Schuster // Naturwissenschaften. – 1977. – Vol. 64. – № 11. – P. 541-565.
131. Eigen, M. Steps towards life: a perspective on evolution/ M. Eigen, R. Winkler-Oswatitsch, P. Woolley // Oxford: Oxford University Press. - 1992. - 173 p.
132. Fajs, L. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia / L. Fajs, E. Durmisi, N. Knap, F. Strle, T. Avsic-Zupanc // PloS one. – 2012. – Vol. 7. – № 11. – P. e48420.
133. Farfan-Ale, J. A. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico / J. A. Farfan-Ale, M. A. Lorono-Pino, J. E. Garcia-Rejon, E. Hovav, A. M. Powers, M. Lin, K. S. Dorman, K. B. Platt, L. C. Bartholomay, V. Soto, B. J. Beaty, R. S. Lanciotti, B. J. Blitvich // Am J Trop Med Hyg. – 2009. – Vol. 80. – № 1. – P. 85-95.
134. Filippova, N. A. A hypothesis for the palaeogenesis of the distribution of the main vectors for Lyme disease / N. A. Filippova // Modern acarology. – 1991. – Vol. 1. – P. 109-118.
135. Filippova, N. A. Forms of sympatry and possible ways of microevolution of closely related species of the group *Ixodes ricinus* - *persulcatus* (Ixodidae) / N. A. Filippova // Acta Zoologica Lituanica. – 2002. – Vol. 12. – № 3. – P. 215-227.
136. Foley, J. Co-phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* and its vectors, *Ixodes* spp. ticks / J. Foley, N. C. Nieto, P. Foley, M. B. Teglás // Exp Appl Acarol. – 2008. – Vol. 45. – № 3-4. – P. 155-170.

137. Froissart, R. Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant virus / R. Froissart, Y. Michalakakis, S. Blanc // *Phytopathology*. – 2002. – Vol. 92. – № 6. – P. 576-579.
138. Froissart, R. Co-infection weakens selection against epistatic mutations in RNA viruses / R. Froissart, C. O. Wilke, R. Montville, S. K. Remold, L. Chao, P. E. Turner // *Genetics*. – 2004. – Vol. 168. – № 1. – P. 9-19.
139. Fukunaga, M. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences / M. Fukunaga, M. Yabuki, A. Hamase, J. H. Oliver, Jr., M. Nakao // *J Parasitol*. – 2000. – Vol. 86. – № 1. – P. 38-43.
140. Gao, G. F. Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides / G. F. Gao, M. H. Hussain, H. W. Reid, E. A. Gould // *Virus Res*. – 1993. – Vol. 30. – № 2. – P. 129-144.
141. García-Arenal, F. Variation and evolution of plant virus populations / F. García-Arenal, A. Fraile, J. M. Malpica // *International Microbiology*. – 2003. – Vol. 6. – № 4. – P. 225-232.
142. García-Arriaza, J. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation / J. García-Arriaza, S. C. Manrubia, M. Toja, E. Domingo, C. Escarmís // *Journal of virology*. – 2004. – Vol. 78. – № 21. – P. 11678-11685.
143. Gaumann, R. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland / R. Gaumann, D. Ruzek, K. Muhlemann, M. Strasser, C. M. Beuret // *J Med Virol*. – 2011. – Vol. 83. – № 5. – P. 853-863.

144. Gaunt, M. W. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography / M. W. Gaunt, A. A. Sall, X. de Lamballerie, A. K. Falconar, T. I. Dzhivanian, E. A. Gould // *J Gen Virol.* – 2001. – Vol. 82. – № Pt 8. – P. 1867-1876.
145. Complementation between Sindbis viral RNAs produces infectious particles with a bipartite genome / U. Geigenmüller-Gnirke, B. Weiss, R. Wright, S. Schlesinger // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1991. – Vol. 88. – № 8. – P. 3253-3257.
146. Geleziunas, R. Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1 / R. Geleziunas, S. Bour, M. A. Wainberg // *The FASEB journal.* – 1994. – Vol. 8. – № 9. – P. 593-600.
147. Golovljova, I. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype / I. Golovljova, O. Katargina, J. Geller, T. Tallo, V. Mittzenkov, S. Vene, K. Nemirov, A. Kutsenko, G. Kilosanidze, V. Vasilenko, A. Plyusnin, A. Lundkvist // *Int J Med Microbiol.* – 2008. – Vol. 298. – № S.1. – P. 108-120.
148. Gorev, N. E. The serological differentiation of viruses in the tick-borne encephalitis subgroup by the gel-diffusion method / N. E. Gorev, A. A. Smorodincev // *Bull World Health Organ.* – 1968. – Vol. 38. – № 3. – P. 389-399.
149. Gould, E. A. Evolution, epidemiology, and dispersal of flaviviruses revealed by molecular phylogenies / E. A. Gould, X. de Lamballerie, P. M. Zanotto, E. C. Holmes // *Adv Virus Res.* – 2001. – Vol. 57. – P. 71-103.
150. Gould, S. J. Punctuated equilibria: the tempo and mode of evolution reconsidered / S. J. Gould, N. Eldredge // *Paleobiology.* – 1977. – P. 115-151.

151. Grard, G. Ngoye virus: a novel evolutionary lineage within the genus Flavivirus / G. Grard, J. J. Lemasson, M. Sylla, A. Dubot, S. Cook, J. F. Molez, X. Pourrut, R. Charrel, J. P. Gonzalez, U. Munderloh, E. C. Holmes, X. de Lamballerie // J Gen Virol. – 2006. – Vol. 87. – № Pt 11. – P. 3273-3277.
152. Grard, G. Genomics and evolution of Aedes-borne flaviviruses / G. Grard, G. Moureau, R. N. Charrel, E. C. Holmes, E. A. Gould, X. de Lamballerie // Journal of General Virology. – 2010. – Vol. 91. – № 1. – P. 87-94.
153. Grard, G. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy / G. Grard, G. Moureau, R. N. Charrel, J. J. Lemasson, J. P. Gonzalez, P. Gallian, T. S. Gritsun, E. C. Holmes, E. A. Gould, X. de Lamballerie // Virology. – 2007. – Vol. 361. – № 1. – P. 80-92.
154. Gresikova, M. Isolation and identification of tick-borne encephalitis virus from a bank vole (*Clethrionomys glareolus*) trapped in the vicinity of Radimovsky forest (Western Slovakia) / M. Gresikova, M. Mrciak, V. Brtek, M. Sekeyov // International Arbeitskolloquium uber Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa, Burgenland, Biologisches Forschungsinstitut, Graz. – 1976. – P. 105-110.
155. Gresikova, M. Studies on preparation of a tick-borne encephalitis (TBE) vaccine from the Skalica strain / M. Gresikova, M. Sekeyova, K. Marcinka, F. Ciampor // Acta virologica. – 1986. – Vol. 30. – № 3. – P. 243-248.
156. Gritsun, T. S. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis / T. S. Gritsun, T. V. Frolova, A. I. Zhankov, M. Armesto, S. L. Turner, M. P. Frolova, V. V. Pogodina, V. A. Lashkevich, E. A. Gould // J Virol. – 2003. – Vol. 77. – № 1. – P. 25-36.

157. Gritsun, T. S. Tick-borne encephalitis / T. S. Gritsun, V. A. Lashkevich, E. A. Gould // *Antiviral Res.* – 2003. – Vol. 57. – № 1-2. – P. 129-146.
158. Guirakhoo, F. The relationship between the flaviviruses Skalicek and Langat as revealed by monoclonal antibodies, peptide mapping and RNA sequence analysis / F. Guirakhoo, F. X. Heinz, C. W. Mandl, H. Holzmann, C. Kunz, M. Gresikova // *J Gen Virol.* – 1991. – Vol. 72 ( Pt 2). – P. 333-338.
159. Guirakhoo, F. Evidence for antigenic stability of tick-borne encephalitis virus by the analysis of natural isolates / F. Guirakhoo, A. C. Radda, F. X. Heinz, C. Kunz // *The Journal of general virology.* – 1987. – Vol. 68 ( Pt 3). – P. 859-864.
160. Haglund, M. Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden / M. Haglund, S. Vene, M. Forsgren, G. Gunther, B. Johansson, M. Niedrig, A. Plyusnin, L. Lindquist, A. Lundkvist // *J Med Virol.* – 2003. – Vol. 71. – № 4. – P. 610-621.
161. Hancock, J. M. 'Compensatory slippage' in the evolution of ribosomal RNA genes / J. M. Hancock, G. A. Dover // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol. 18. – № 20. – P. 5949-5954.
162. Hase, T. Morphogenesis of flaviviruses / T. Hase, P. L. Summers, K. H. Eckels, J. R. Putnak // *Virally Infected Cells: Springer.* - 1989. – C. 275-305.
163. Hayasaka, D. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia / D. Hayasaka, L. Ivanov, G. N. Leonova, A. Goto, K. Yoshii, T. Mizutani, H. Kariwa, I. Takashima // *J Gen Virol.* – 2001. – Vol. 82. – № Pt 6. – P. 1319-1328.
164. Hayasaka, D. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia / D. Hayasaka, Y. Suzuki, H. Kariwa, L. Ivanov, V. Volkov, V. Demenev, T. Mizutani, T.

- Gojobori, I. Takashima // J Gen Virol. – 1999. – Vol. 80 ( Pt 12). – P. 3127-3135.
165. Heinz, F. X. Flavivirus structure and membrane fusion / F. X. Heinz, S. L. Allison // Advances in virus research. – 2003. – Vol. 59. – P. 63-97.
  166. Heinz, F. X. Homogeneity of the structural glycoprotein from European isolates of tick-borne encephalitis virus: comparison with other flaviviruses / F. X. Heinz, C. Kunz // The Journal of general virology. – 1981. – Vol. 57. – № Pt 2. – P. 263-274.
  167. Heinz, F. X. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other flaviviruses / F. X. Heinz, C. Kunz // The Journal of general virology. – 1982. – Vol. 62 (Pt 2). – P. 271-285.
  168. Heinze, D. M. Revisiting the clinal concept of evolution and dispersal for the tick-borne flaviviruses by using phylogenetic and biogeographic analyses / D. M. Heinze, E. A. Gould, N. L. Forrester // J Virol. – 2012. – Vol. 86. – № 16. – P. 8663-8671.
  169. Hewitt, G. M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary / G. M. Hewitt // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2004. – Vol. 359. – № 1442. – P. 183-195.
  170. Hewitt, G. M. The structure of biodiversity - insights from molecular phylogeography / G. M. Hewitt // Front Zool. – 2004. – Vol. 1. – № 1. – P. 4.
  171. Holland, J. Rapid evolution of RNA genomes / J. Holland, K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol, S. VandePol // Science. – 1982. – Vol. 215. – № 4540. – P. 1577-1585.
  172. Holland J. J. Continuum of change in RNA virus genomes / J. J. Holland // Concepts in viral pathogenesis: Springer. - 1984. – C. 137-143.

173. Holland, J. J. Purification of defective interfering T particles of vesicular stomatitis and rabies viruses generated in vivo in brains of newborn mice / J. J. Holland, L. P. Villarreal // *Virology*. – 1975. – Vol. 67. – № 2. – P. 438-449.
174. Holmes, E. C. The evolution and emergence of RNA viruses/ E. C. Holmes // Oxford; New York: Oxford University Press. – 2009. – 254 p.
175. Holmes, E. C. Evolution and emergence of RNA viruses / E. C. Holmes // Oxford: Oxford University Press. – 2009. – 254 p.
176. Holmes, E. C. The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses / E. C. Holmes // *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. – 2009. – Vol. 40. – P. 353-372.
177. Holmes, E. C. Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses? / E. C. Holmes, A. Moya // *Journal of virology*. – 2002. – Vol. 76. – № 1. – P. 460-462.
178. Hoogstraal, H. Ticks (Ixodidae) on birds migrating from Europe and Asia to Africa 1959-61 / H. Hoogstraal, M. N. Kaiser, M. A. Traylor, E. Guindy, S. Gaber // *Bull World Health Organ*. – 1963. – Vol. 28. – P. 235-262.
179. Hoshino, K. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan / K. Hoshino, H. Isawa, Y. Tsuda, K. Yano, T. Sasaki, M. Yuda, T. Takasaki, M. Kobayashi, K. Sawabe // *Virology*. – 2007. – Vol. 359. – № 2. – P. 405-414.
180. <http://www.ocsen.ru/>. Официальный сайт ФГУЗ "Центр гигиены и эпидемиологии Свердловской области". URL: <http://www.ocsen.ru/>.
181. Huang, A. S. Defective viral particles and viral disease processes / A. S. Huang, D. Baltimore // *Nature*. – 1970. – Vol. 226. – P. 325-327.



182. Huang, I. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection / I. Huang, W. Li, J. Sui, W. Marasco, H. Choe, M. Farzan // Journal of virology. – 2008. – Vol. 82. – № 10. – P. 4834-4843.
183. Hueffer, K. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor / K. Hueffer, J. S. Parker, W. S. Weichert, R. E. Geisel, J.-Y. Sgro, C. R. Parrish // Journal of virology. – 2003. – Vol. 77. – № 3. – P. 1718-1726.
184. Huhtamo, E. Characterization of a novel flavivirus from mosquitoes in northern europe that is related to mosquito-borne flaviviruses of the tropics / E. Huhtamo, N. Putkuri, S. Kurkela, T. Manni, A. Vaheri, O. Vapalahti, N. Y. Uzcátegui // Journal of virology. – 2009. – Vol. 83. – № 18. – P. 9532-9540.
185. Jaaskelainen, A. E. Siberian subtype tick-borne encephalitis virus, Finland / A. E. Jaaskelainen, T. Tikkakoski, N. Y. Uzcategui, A. N. Alekseev, A. Vaheri, O. Vapalahti // Emerg Infect Dis. – 2006. – Vol. 12. – № 10. – P. 1568-1571.
186. Jenkins, G. M. Evidence for the non-quasispecies evolution of RNA viruses / G. M. Jenkins, M. Worobey, C. H. Woelk, E. C. Holmes // Molecular biology and evolution. – 2001. – Vol. 18. – № 6. – P. 987-994.
187. Jones, C. T. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein / C. T. Jones, L. Ma, J. W. Burgner, T. D. Groesch, C. B. Post, R. J. Kuhn // Journal of virology. – 2003. – Vol. 77. – № 12. – P. 7143-7149.
188. Jones, L. D. Transmission of louping ill virus between infected and uninfected ticks co-feeding on mountain hares / L. D. Jones, M. Gaunt, R. S. Hails, K. Laurenson, P. J. Hudson, H. Reid, P. Henbest, E. A. Gould // Med Vet Entomol. – 1997. – Vol. 11. – № 2. – P. 172-176.

189. Karan, L. S. Genetic characteristics of TBE strains from different regions of Russia in period 1937-2007 / L. S. Karan, V. V. Pogodina, L. S. Levina, N. G. Bochkova, G. V. Malenko, N. M. Kolyasnikova, E. G. Bezrukova, T. A. Shopenskaya, S. I. Braslavskaya, M. M. Verkhovzina, I. V. Kozlova, A. G. Trukhina, T. V. Demina, Y. P. Dzhioev, E. K. Doroshchenko, O. V. Lisak, V. I. Zlobin, V. M. Kogan, M. A. Khasnatinov, V. V. Yakimenko, O. V. Kalmin // *Unpublished*. – 2008.
190. Kiermayr, S. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles / S. Kiermayr, R. M. Kofler, C. W. Mandl, P. Messner, F. X. Heinz // *Journal of virology*. – 2004. – Vol. 78. – № 15. – P. 8078-8084.
191. Kim, S. Y. Molecular evidence for tick-borne encephalitis virus in ticks in South Korea / S. Y. Kim, Y. E. Jeong, S. M. Yun, I. Y. Lee, M. G. Han, Y. R. Ju // *Med Vet Entomol*. – 2009. – Vol. 23. – № 1. – P. 15-20.
192. Kim, S. Y. Isolation of Tick-Borne Encephalitis Viruses from Wild Rodents, South Korea / S. Y. Kim, S. M. Yun, M. G. Han, I. Y. Lee, N. Y. Lee, Y. E. Jeong, B. C. Lee, Y. R. Ju // *Vector Borne Zoonotic Dis*. – 2008. – Vol. 8. – № 1.- P. 7-14.
193. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // *J Mol Evol*. – 1980. – Vol. 16. – № 2. – P. 111-120.
194. King, A. M. Q. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / A. M. Q., King M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz // San Diego: Elsevier Academic Press. - 2011. – 1338 p.

195. Ko, S. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ticks from southern Korea / S. Ko, J.-G. Kang, S. Y. Kim, H.-C. Kim, T. A. Klein, S.-T. Chong, W. J. Sames, S.-M. Yun, Y.-R. Ju, J.-S. Chae // Journal of veterinary science. – 2010. – Vol. 11. – № 3. – P. 197-203.
196. Kolodziejek, J. Barkedji virus, a novel mosquito-borne flavivirus identified in *Culex perexiguus* mosquitoes, Israel, 2011 / J. Kolodziejek, K. Pachler, H. Bin, E. Mendelson, L. Shulman, L. Orshan, N. Nowotny // J Gen Virol. – 2013. – Vol. 94. – № Pt 11. – P. 2449-2457.
197. Kondo, R. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila* / R. Kondo, Y. Satta, E. T. Matsuura, H. Ishiwa, N. Takahata, S. I. Chigusa // Genetics. – 1990. – Vol. 126. – № 3. – P. 657-663.
198. Konnai, S. Establishment of a laboratory colony of taiga tick *Ixodes persulcatus* for tick-borne pathogen transmission studies / S. Konnai, Y. Saito, H. Nishikado, S. Yamada, S. Imamura, A. Mori, T. Ito, M. Onuma, K. Ohashi // Jpn J Vet Res. – 2008. – Vol. 55. – № 2-3. – P. 85-92.
199. Kovalev, S. Y. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries / S. Y. Kovalev, D. N. Chernykh, V. S. Kokorev, T. E. Snitkovskaya, V. V. Romanenko // J Gen Virol. – 2009. – Vol. 90. – № Pt 12. – P. 2884-2892.
200. Kovalev, S. Y. Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union / S. Y. Kovalev, V. S. Kokorev, I. V. Belyaeva // The Journal of general virology. – 2010. – Vol. 91. – № Pt 12. – P. 2941-2946.
201. Kozlovskaya, L. I. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus / L. I. Kozlovskaya, D. I. Osolodkin, A. S. Shevtsova, L. Romanova, Y. V.

- Rogova, T. I. Dzhivanian, V. N. Lyapustin, G. P. Pivanova, A. P. Gmyl, V. A. Palyulin, G. G. Karganova // *Virology*. – 2010. – Vol. 398. – № 2. – P. 262-272.
202. Kuno, G. Phylogeny of the genus *Flavivirus* / G. Kuno, G. J. Chang, K. R. Tsuchiya, N. Karabatsos, C. B. Cropp // *J Virol*. – 1998. – Vol. 72. – № 1. – P. 73-83.
203. Labuda, M. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks / M. Labuda, L. D. Jones, T. Williams, V. Danielova, P. A. Nuttall // *J Med Entomol*. – 1993. – Vol. 30. – № 1. – P. 295-299.
204. Labuda, M. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts / M. Labuda, O. Kozuch, E. Zuffova, E. Eleckova, R. S. Hails, P. A. Nuttall // *Virology*. – 1997. – Vol. 235. – № 1. – P. 138-143.
205. Lambert, C. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures / C. Lambert, N. Leonard, X. De Bolle, E. Depiereux // *Bioinformatics*. – 2002. – Vol. 18. – № 9. – P. 1250-1256.
206. Leonova, G. N. Louping ill virus (LIV) in the Far East / G. N. Leonova, I. G. Kondratov, O. S. Maystrovskaya, I. Takashima, S. I. Belikov // *Archives of Virology*. – 2014. – P. 1-11.
207. Leonova, G. N. Characterization of Powassan viruses from Far Eastern Russia / G. N. Leonova, I. G. Kondratov, V. A. Ternovoi, E. V. Romanova, E. V. Protopopova, E. V. Chausov, E. V. Pavlenko, E. I. Ryabchikova, S. I. Belikov, V. B. Loktev // *Arch Virol*. – 2009. – Vol. 154. – № 5. – P. 811-820.
208. Li, W. Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: insight from ACE2-S-protein interactions / W. Li, S.-K. Wong,

- F. Li, J. H. Kuhn, I.-C. Huang, H. Choe, M. Farzan // *Journal of virology*. – 2006. – Vol. 80. – № 9. – P. 4211-4219.
209. Li, W. H. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences / W. H. Li, M. Tanimura, P. M. Sharp // *Mol Biol Evol*. – 1988. – Vol. 5. – № 4. – P. 313-330.
  210. Lindenbach, B. D. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function / B. D. Lindenbach, C. M. Rice // *Journal of virology*. – 1999. – Vol. 73. – № 6. – P. 4611-4621.
  211. B. D. Lindenbach, C. M. Rice. *Flaviviridae: the viruses and their replication* // *Fields virology*, 4th ed Knipe, D. M. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – C. 991-1041.
  212. Lindenbach, B. D. *Molecular biology of flaviviruses* / B. D. Lindenbach, C. M. Rice // *Advances in virus research*. – 2003. – Vol. 59. – P. 23-61.
  213. Liu, W. J. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins / W. J. Liu, X. J. Wang, V. V. Mokhonov, P.-Y. Shi, R. Randall, A. A. Khromykh // *Journal of virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 3. – P. 1934-1942.
  214. Lundkvist, K. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes / K. Lundkvist, S. Vene, I. Golovljova, V. Mavtchoutko, M. Forsgren, V. Kalnina, A. Plyusnin // *J Med Virol*. – 2001. – Vol. 65. – № 4. – P. 730-735.
  215. Ma, L. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold / L. Ma, C. T. Jones, T. D. Groesch, R. J. Kuhn, C. B. Post // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 10. – P. 3414-3419.

216. Mackenzie, J. M. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A / J. M. Mackenzie, A. A. Khromykh, M. K. Jones, E. G. Westaway // *Virology*. – 1998. – Vol. 245. – № 2. – P. 203-215.
217. Mandl, C. W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis / C. W. Mandl // *Virus Res.* – 2005. – Vol. 111. – № 2. – P. 161-174.
218. Mandl, C. W. Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses / C. W. Mandl, F. X. Heinz, C. Kunz // *Virology*. – 1988. – Vol. 166. – № 1. – P. 197-205.
219. Mandl, C. W. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses / C. W. Mandl, F. X. Heinz, E. Stöckl, C. Kunz // *Virology*. – 1989. – Vol. 173. – № 1. – P. 291-301.
220. Mandl, C. W. Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses / C. W. Mandl, H. Holzmann, C. Kunz, F. X. Heinz // *Virology*. – 1993. – Vol. 194. – № 1. – P. 173-184.
221. Mandl, C. W. Sequence of the genes encoding the structural proteins of the low-virulence tick-borne flaviviruses Langat TP21 and Yelantsev / C. W. Mandl, L. Iacono-Connors, G. Wallner, H. Holzmann, C. Kunz, F. X. Heinz // *Virology*. – 1991. – Vol. 185. – № 2. – P. 891-895.
222. Mandl, C. W. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo / C. W. Mandl, H. Kroschewski, S.

- L. Allison, R. Kofler, H. Holzmann, T. Meixner, F. X. Heinz // J Virol. – 2001. – Vol. 75. – № 12. – P. 5627-5637.
223. Mansky, L. M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase / L. M. Mansky, H. M. Temin // Journal of virology. – 1995. – Vol. 69. – № 8. – P. 5087-5094.
224. Marin, M. S. Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus: different evolutionary rates in the genus Flavivirus / M. S. Marin, P. M. Zanotto, T. S. Gritsun, E. A. Gould // Virology. – 1995. – Vol. 206. – № 2. – P. 1133-1139.
225. McGuire, K. Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis / K. McGuire, E. C. Holmes, G. F. Gao, H. W. Reid, E. A. Gould // J Gen Virol. – 1998. – Vol. 79 ( Pt 5). – P. 981-988.
226. McLain, D. K. Evolution of transcript structure and base composition of rDNA expansion segment D3 in ticks / D. K. McLain // Heredity. – 2001. – Vol. 87. – № Pt 5. – P. 544-557.
227. McLain, D. K. Interspecific and geographical variation in the sequence of rDNA expansion segment D3 of Ixodes ticks (Acari: Ixodidae) / D. K. McLain, J. Li, J. H. Oliver, Jr. // Heredity. – 2001. – Vol. 86. – № Pt 2. – P. 234-242.
228. Medeiros, D. B. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state / D. B. Medeiros, M. R. Nunes, P. F. Vasconcelos, G. J. Chang, G. Kuno // J Gen Virol. – 2007. – Vol. 88. – № Pt 8. – P. 2237-2246.
229. Mehla, R. Recent ancestry of Kyasanur Forest disease virus / R. Mehla, S. R. Kumar, P. Yadav, P. V. Barde, P. N. Yergolkar, B. R. Erickson, S. A. Carroll,

- A. C. Mishra, S. T. Nichol, D. T. Mourya // *Emerg Infect Dis.* – 2009. – Vol. 15. – № 9. – P. 1431-1437.
230. Michot, B. Secondary structure of mouse 28S rRNA and general model for the folding of the large rRNA in eukaryotes / B. Michot, N. Hassouna, J. P. Bachellerie // *Nucleic Acids Res.* – 1984. – Vol. 12. – № 10. – P. 4259-4279.
231. Mickiene, A. Tick-borne encephalitis virus in Lithuania / A. Mickiene, S. Vene, I. Golovljova, A. Laiskonis, L. Lindquist, A. Plyusnin, A. Lundkvist // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2001. – Vol. 20. – № 12. – P. 886-888.
232. Mikryukova, T. P. Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia) / T. P. Mikryukova, N. S. Moskvitina, Y. V. Kononova, I. G. Korobitsyn, M. Y. Kartashov, O. Y. Tyuten, E. V. Protopopova, V. N. Romanenko, E. V. Chausov, S. I. Gashkov // *Ticks and tick-borne diseases.* – 2014. – Vol. 5. – № 2. – P. 145-151.
233. Modis, Y. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein / Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, S. C. Harrison // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2003. – Vol. 100. – № 12. – P. 6986-6991.
234. Modis, Y. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein / Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, S. C. Harrison // *Journal of virology.* – 2005. – Vol. 79. – № 2. – P. 1223-1231.
235. Montville, R. Evolution of mutational robustness in an RNA virus / R. Montville, R. Froissart, S. K. Remold, O. Tenaillon, P. E. Turner // *PLoS biology.* – 2005. – Vol. 3. – № 11. – P. e381.
236. Morales-Betoulle, M. E. Culex flavivirus isolates from mosquitoes in Guatemala / M. E. Morales-Betoulle, M. L. Monzon Pineda, S. M. Sosa, N.



- Panella, M. R. Lopez, C. Cordon-Rosales, N. Komar, A. Powers, B. W. Johnson // J Med Entomol. – 2008. – Vol. 45. – № 6. – P. 1187-1190.
237. Moreno, I. M. A mutation in tomato aspermy cucumovirus that abolishes cell-to-cell movement is maintained to high levels in the viral RNA population by complementation / I. M. Moreno, J. M. Malpica, E. Rodríguez-Cerezo, F. Garcia-Arenal // Journal of virology. – 1997. – Vol. 71. – № 12. – P. 9157-9162.
238. Mota, J. Phylogenetic analysis of the envelope protein (domain III) of dengue 4 viruses / J. Mota, J. Ramos-Castañeda, R. Rico-Hesse, C. Ramos // salud pública de méxico. – 2002. – Vol. 44. – № 3. – P. 228-236.
239. Moya, A. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses / A. Moya, E. C. Holmes, F. González-Candelas // Nature Reviews Microbiology. – 2004. – Vol. 2. – № 4. – P. 279-288.
240. Munoz-Jordan, J. 8 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus / J. Munoz-Jordan, G. Sanchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, A. Garcia-Sastre // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 14333-14339.
241. Nava, S. An overview of systematics and evolution of ticks / S. Nava, A. A. Guglielmone, A. J. Mangold // Front Biosci. – 2009. – Vol. 14. – P. 2857-2877.
242. Navajas, M. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review / M. Navajas, B. Fenton // Exp Appl Acarol. – 2000. – Vol. 24. – № 10-11. – P. 751-774.
243. Nisbet, D. J. Identification of new flaviviruses in the Kokobera virus complex / D. J. Nisbet, K. J. Lee, A. F. van den Hurk, C. A. Johansen, G. Kuno, G. J. Chang, J. S. Mackenzie, S. A. Ritchie, R. A. Hall // J Gen Virol. – 2005. – Vol. 86. – № Pt 1. – P. 121-124.

244. Norris, D. E. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes / D. E. Norris, J. S. Klompen, J. E. Keirans, W. C. t. Black // *J Med Entomol.* – 1996. – Vol. 33. – № 1. – P. 78-89.
245. Nowak, T. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus / T. Nowak, G. Wengler // *Virology.* – 1987. – Vol. 156. – № 1. – P. 127-137.
246. Ohno, O. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a / O. Ohno, M. Mizokami, R.-R. Wu, M. G. Saleh, K.-i. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, J. Lau // *Journal of clinical microbiology.* – 1997. – Vol. 35. – № 1. – P. 201-207.
247. Paabo, S. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification / S. Paabo, D. M. Irwin, A. C. Wilson // *J Biol Chem.* – 1990. – Vol. 265. – № 8. – P. 4718-4721.
248. Parrish, C. R. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases / C. R. Parrish, E. C. Holmes, D. M. Morens, E. Park, D. S. Burke, C. H. Calisher, C. A. Laughlin, L. J. Saif, P. Daszak // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2008. – Vol. 72. – № 3. – P. 457-470.
249. Pletnev, A. G. Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses / A. G. Pletnev, M. Bray, J. Huggins, C. J. Lai // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – Vol. 89. – № 21. – P. 10532-10536.
250. Pletnev, A. G. Tick-borne encephalitis virus genome. The nucleotide sequence coding for virion structural proteins / A. G. Pletnev, V. F. Yamshchikov, V. M. Blinov // *FEBS Lett.* – 1986. – Vol. 200. – № 2. – P. 317-321.

251. Pletnev, A. G. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus / A. G. Pletnev, V. F. Yamshchikov, V. M. Blinov // *Virology*. – 1990. – Vol. 174. – № 1. – P. 250-263.
252. Qiu, W. G. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States / W. G. Qiu, D. E. Dykhuizen, M. S. Acosta, B. J. Luft // *Genetics*. – 2002. – Vol. 160. – № 3. – P. 833-849.
253. Rampas, J. Isolation of tick-borne encephalitis virus from ticks *Ixodes ricinus* / J. Rampas, F. Gallia // *Cas. Lek. Cesk.* – 1949. – Vol. 88. – P. 1179-1180.
254. Reanney, D. The evolution of RNA viruses / D. Reanney // *Annual Reviews in Microbiology*. – 1982. – Vol. 36. – № 1. – P. 47-73.
255. Reanney, D. The molecular evolution of viruses / D. Reanney // *The microbe*. Cambridge University Press, Cambridge. – 1984. – P. 175-196.
256. Rees, D. J. Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African *Hyalomma* (Acari: Ixodidae) / D. J. Rees, M. Dioli, L. R. Kirkendall // *Mol Phylogenet Evol.* – 2003. – Vol. 27. – № 1. – P. 131-142.
257. H. W. Reid. Epidemiology of louping ill // *Vectors in Virus Biology* Harrap, M. A. M. a. K. A. – London : Academic Press, 1984. – C. 161-178.
258. Rey, F. A. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution / F. A. Rey, F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, S. C. Harrison // *Nature*. – 1995. – Vol. 375. – № 6529. – P. 291-298.
259. Extinction by hybridization and introgression / J. M. Rhymer, D. Simberloff // *Annual Review of Ecology and Systematics*. – 1996. – P. 83-109.

260. Rice, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication / C. M. Rice // Fields virology. – 1996. – Vol. 3. – P. 931-959.
261. Roehrig, J. T. Antigenic structure of flavivirus proteins / J. T. Roehrig // Adv Virus Res. – 2003. – Vol. 59. – P. 141-175.
262. Romanova, L. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation / L. Romanova, A. P. Gmyl, T. I. Dzhivanian, D. V. Bakmutov, A. N. Lukashev, L. V. Gmyl, A. A. Rummyantsev, L. A. Burenkova, V. A. Lashkevich, G. G. Karganova // Virology. – 2007. – Vol. 362. – № 1. – P. 75-84.
263. Růžek, D. Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks / D. Růžek, L. Bell-Sakyi, J. Kopecký, L. Grubhoffer // Virus Research. – 2008. – Vol. 137. – № 1. – P. 142-146.
264. Ruzek, D. The supposedly attenuated hy-HK variant of highly virulent Hypr strain of tick-borne encephalitis virus is obviously a strain of Langat virus / D. Ruzek, J. Sterba, J. Kopecky, L. Grubhoffer // Acta Virol. – 2006. – Vol. 50. – № 4. – P. 277-278.
265. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Mol Biol Evol. – 1987. – Vol. 4. – № 4. – P. 406-425.
266. Sang, R. C. Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water Aedes mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya / R. C. Sang, A. Gichogo, J. Gachoya, M. D. Dunster, V. Ofula, A. R. Hunt, M. B. Crabtree, B. R. Miller, L. M. Dunster // Arch Virol. – 2003. – Vol. 148. – № 6. – P. 1085-1093.

267. Sayle, R. A. RASMOL: biomolecular graphics for all / R. A. Sayle, E. J. Milner-White // Trends Biochem Sci. – 1995. – Vol. 20. – № 9. – P. 374.
268. Schultz, U. Evolution of pig influenza viruses / U. Schultz, W. M. Fitch, S. Ludwig, J. Mandler, C. Scholtissek // Virology. – 1991. – Vol. 183. – № 1. – P. 61-73.
269. Shamanin, V. A. Differentiation of strains of tick-borne encephalitis virus by means of RNA-DNA hybridization / V. A. Shamanin, A. G. Pletnev, S. G. Rubin, V. I. Zlobin // J Gen Virol. – 1990. – Vol. 71 ( Pt 7). – P. 1505-1515.
270. Sharp, C. P. Widespread infection with homologues of human parvoviruses B19, PARV4, and human bocavirus of chimpanzees and gorillas in the wild / C. P. Sharp, M. LeBreton, K. Kantola, A. Nana, J. Diffo, C. F. Djoko, U. Tamoufe, J. A. Kiyang, T. G. Babila, E. M. Ngole // Journal of virology. – 2010. – Vol. 84. – № 19. – P. 10289-10296.
271. Simpson, G. G. Tempo and mode in evolution / G. G. Simpson // No. 15. - Columbia University Press. - 1944. - p.
272. Smallwood, S. Intragenic complementation and oligomerization of the L subunit of the Sendai virus RNA polymerase / S. Smallwood, B. Çevik, S. A. Moyer // Virology. – 2002. – Vol. 304. – № 2. – P. 235-245.
273. Streicker, D. G. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies virus in bats / D. G. Streicker, A. S. Turmelle, M. J. Vonhof, I. V. Kuzmin, G. F. McCracken, C. E. Rupprecht // Science. – 2010. – Vol. 329. – № 5992. – P. 676-679.
274. Subbotina, E. L. Molecular Evolution of the Tick-Borne Encephalitis and Powassan Viruses / E. L. Subbotina, V. B. Loktev // Molecular Biology. – 2012. – Vol. 46. – № 1. – P. 75-84.

275. Suzuki, Y. Multiple transmissions of tick-borne encephalitis virus between Japan and Russia / Y. Suzuki // *Genes Genet Syst.* – 2007. – Vol. 82. – № 3. – P. 187-195.
276. Tamura, K. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // *Mol Biol Evol.* – 2011. – Vol. 28. – № 10. – P. 2731-2739.
277. Ternovoi, V. A. Tick-borne encephalitis with hemorrhagic syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999 / V. A. Ternovoi, G. P. Kurzhukov, Y. V. Sokolov, G. Y. Ivanov, V. A. Ivanisenko, A. V. Loktev, R. W. Ryder, S. V. Netesov, V. B. Loktev // *Emerg Infect Dis.* – 2003. – Vol. 9. – № 6. – P. 743-746.
278. Tolou, H. J. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences / H. J. Tolou, P. Couissinier-Paris, J. P. Durand, V. Mercier, J. J. de Pina, P. de Micco, F. Billoir, R. N. Charrel, X. de Lamballerie // *The Journal of general virology.* – 2001. – Vol. 82. – № Pt 6. – P. 1283-1290.
279. Tuininga, A. R. Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: prevalence and methods / A. R. Tuininga, J. L. Miller, S. U. Morath, T. J. Daniels, R. C. Falco, M. Marchese, S. Sahabi, D. Rosa, K. C. Stafford, 3rd // *J Med Entomol.* – 2009. – Vol. 46. – № 3. – P. 557-565.
280. Tuplin, A. Replication enhancer elements within the open reading frame of tick-borne encephalitis virus and their evolution within the Flavivirus genus / A. Tuplin, D. J. Evans, A. Buckley, I. M. Jones, E. A. Gould, T. S. Gritsun // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol. 39. – № 16. – P. 7034-7048.

281. Tzeng, W. Complementation of a deletion in the rubella virus p150 nonstructural protein by the viral capsid protein / W. Tzeng, T. K. Frey // Journal of virology. – 2003. – Vol. 77. – № 17. – P. 9502-9510.
282. Uchil, P. D. Architecture of the flaviviral replication complex protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments / P. D. Uchil, V. Satchidanandam // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 27. – P. 24388-24398.
283. Uzcategui, N. Y. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination / N. Y. Uzcategui, D. Camacho, G. Comach, R. Cuello de Uzcategui, E. C. Holmes, E. A. Gould // The Journal of general virology. – 2001. – Vol. 82. – № Pt 12. – P. 2945-2953.
284. Uzcategui, N. Y. Rate of evolution and molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in Europe, including two isolations from the same focus 44 years apart / N. Y. Uzcategui, T. Sironen, I. Golovljova, A. E. Jaaskelainen, H. Valimaa, A. Lundkvist, A. Plyusnin, A. Vaheri, O. Vapalahti // The Journal of general virology. – 2012. – Vol. 93. – № Pt 4. – P. 786-796.
285. Venugopal, K. Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of Negishi virus shows very close homology to louping ill virus / K. Venugopal, A. Buckley, H. W. Reid, E. A. Gould // Virology. – 1992. – Vol. 190. – № 1. – P. 515-521.
286. Volk, D. E. Solution structure and antibody binding studies of the envelope protein domain III from the New York strain of West Nile virus / D. E. Volk, D. W. Beasley, D. A. Kallick, M. R. Holbrook, A. D. Barrett, D. G. Gorenstein // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279. – № 37. – P. 38755-38761.

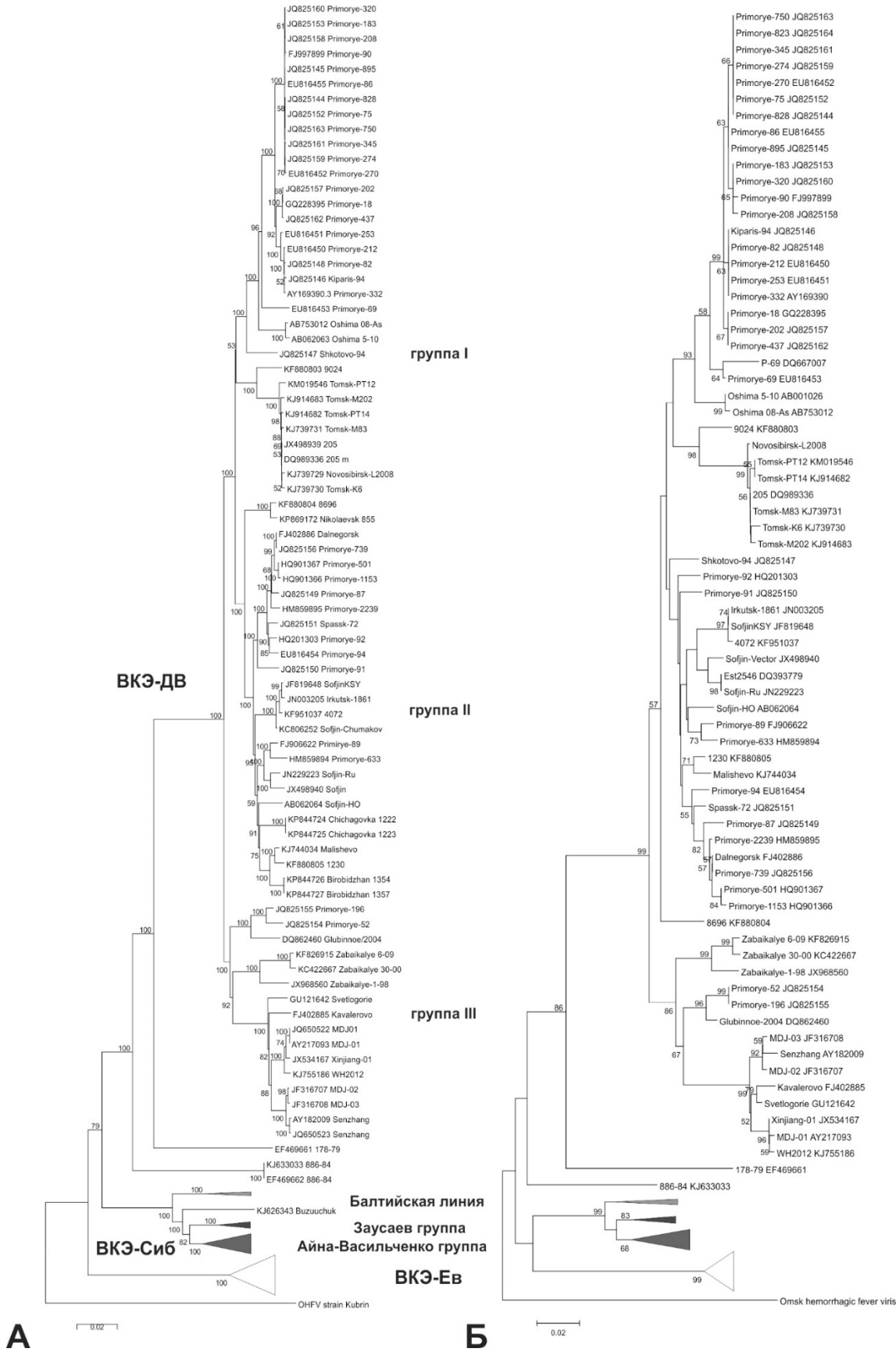
287. Vorndam, V. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes / V. Vorndam, G. Kuno, N. Rosado // *Journal of virological methods*. – 1994. – Vol. 48. – № 2. – P. 237-244.
288. Waldenstrom, J. Migrating birds and tickborne encephalitis virus / J. Waldenstrom, A. Lundkvist, K. I. Falk, U. Garpmo, S. Bergstrom, G. Lindegren, A. Sjostedt, H. Mejlon, T. Fransson, P. D. Haemig, B. Olsen // *Emerg Infect Dis*. – 2007. – Vol. 13. – № 8. – P. 1215-1218.
289. Wallner, G. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus / G. Wallner, C. W. Mandl, C. Kunz, F. X. Heinz // *Virology*. – 1995. – Vol. 213. – № 1. – P. 169-178.
290. Weaver, S. C. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease / S. C. Weaver, A. D. Barrett // *Nature Reviews Microbiology*. – 2004. – Vol. 2. – № 10. – P. 789-801.
291. Weaver, S. C. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease / S. C. Weaver, N. Vasilakis // *Infect Genet Evol*. – 2009. – Vol. 9. – № 4. – P. 523-540.
292. Weidmann, M. Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe / M. Weidmann, D. Ruzek, K. Krivanec, G. Zoller, S. Essbauer, M. Pfeffer, P. M. Zanotto, F. T. Hufert, G. Dobler // *Journal of General Virology*. – 2011. – Vol. 92. – № Pt 8. – P. 1906-1916.
293. Wilke, C. O. Phenotypic mixing and hiding may contribute to memory in viral quasispecies / C. O. Wilke, I. S. Novella // *BMC microbiology*. – 2003. – Vol. 3. – № 1. – P. 11.



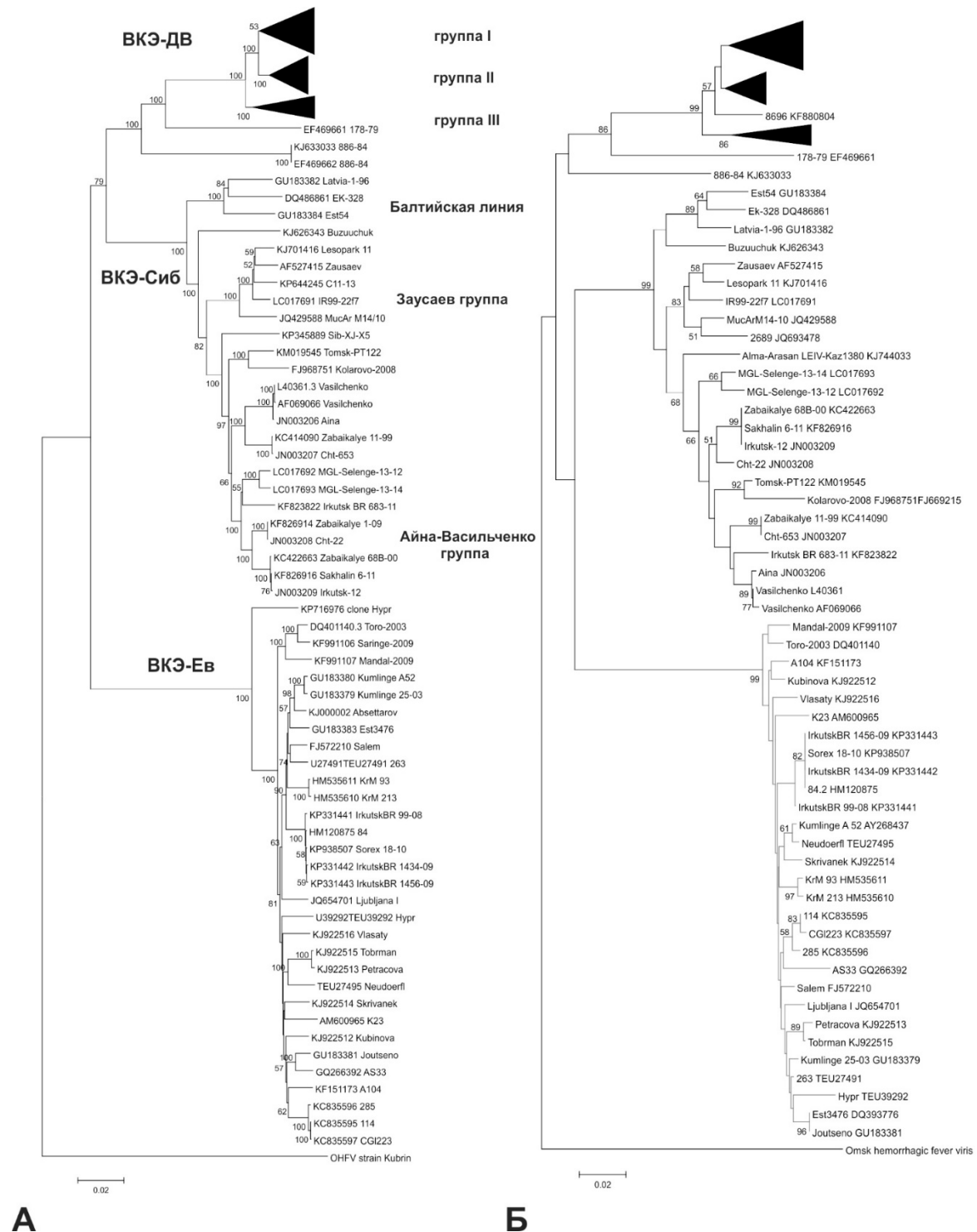
294. Woolhouse, M. E. Population biology of emerging and re-emerging pathogens / M. E. Woolhouse // Trends in microbiology. – 2002. – Vol. 10. – № 10. – P. s3-s7.
295. Woolhouse, M. E. Host range and emerging and reemerging pathogens / M. E. Woolhouse, S. Gowtage-Sequeria // National Academies Press. - 2006. - Vol. 192.
296. Woolhouse, M. E. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps / M. E. Woolhouse, D. T. Haydon, R. Antia // Trends Ecol Evol. – 2005. – Vol. 20. – № 5. – P. 238-244.
297. Woolhouse, M. E. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps / M. E. Woolhouse, D. T. Haydon, R. Antia // Trends in ecology & evolution. – 2005. – Vol. 20. – № 5. – P. 238-244.
298. Xu, G. Molecular phylogenetic analyses indicate that the Ixodes ricinus complex is a paraphyletic group / G. Xu, Q. Q. Fang, J. E. Keirans, L. A. Durden // J Parasitol. – 2003. – Vol. 89. – № 3. – P. 452-457.
299. Yamshchikov, V. F. Nucleotide sequence of the genome region encoding the structural proteins and the NS1 protein of the tick borne encephalitis virus / V. F. Yamshchikov, A. G. Pletnev // Nucleic Acids Res. – 1988. – Vol. 16. – № 15. – P. 7750.
300. Yli-Mattila, T. Species and strain identification of the predatory mite Euseius finlandicus by RAPD-PCR and ITS sequences / T. Yli-Mattila, S. Paavanen-Huhtala, B. Fenton, T. Tuovinen // Exp Appl Acarol. – 2000. – Vol. 24. – № 10-11. – P. 863-880.
301. Yun, S.-M. First complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis virus isolates obtained from wild rodents in South Korea / S.-

- M. Yun, S. Y. Kim, Y. R. Ju, M. G. Han, Y. E. Jeong, J. Ryou // *Virus genes*. – 2011. – Vol. 42. – № 3. – P. 307-316.
302. Yun, S.-M. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks collected from the republic of Korea during 2011–2012 / S.-M. Yun, B. G. Song, W. Choi, W. I. Park, S. Y. Kim, J. Y. Roh, J. Ryou, Y. R. Ju, C. Park, E.-H. Shin // *Osong Public Health and Research Perspectives*. – 2012. – Vol. 3. – № 4. – P. 213-221.
303. Yun, S. M. Analysis of the envelope (E) protein gene of tick-borne encephalitis viruses isolated in South Korea / S. M. Yun, S. Y. Kim, M. G. Han, Y. E. Jeong, T. S. Yong, C. H. Lee, Y. R. Ju // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2009. – Vol. 9. – № 3. – P. 287-293.
304. Zanotto, P. M. An arbovirus cline across the northern hemisphere / P. M. Zanotto, G. F. Gao, T. Gritsun, M. S. Marin, W. R. Jiang, K. Venugopal, H. W. Reid, E. A. Gould // *Virology*. – 1995. – Vol. 210. – № 1. – P. 152-159.
305. Zuker, M. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology / M. Zuker, D. H. Mathews, D. H. Turner // *Springer Netherlands*. - 1999. - P. 11-43.

ПРИЛОЖЕНИЕ I



# ПРИЛОЖЕНИЕ I (продолжение)



**Рисунок.** Дендрограммы, построенные на основе нуклеотидных последовательностей 130 штаммов ВКЭ методом объединения ближайших соседей (neighbor-joining). **А.** – ген полипротеина (10217 н.п.); **Б.** – фрагмент гена Е (454 н.п.). В качестве внешней группы был взят штамм вируса ОГЛ.

## ПРИЛОЖЕНИЕ II

Таблица

Перечень штаммов ВКЭ-Сиб, включенных в филогенетический анализ  
аминокислотных последовательностей фрагмента гликопротеина Е.

Штамм	Место выделения	Год выделения	Источник выделения	№ доступа в GenBank	Ссылки
Absettarov	St. Petersburg region, Russia	1951	Human blood	AF091005	Ecker et al. (1999)
ZZ9	Zell/Ziller, Austria	1985	I. ricinus	AF091020	Ecker et al. (1999)
<b>Кластер А</b>					
101	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	1990	I. persulcatus	EU443259	Tkachev et al. (2008)
1486	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	1999	I. persulcatus	EF469755	Tkachev et al. (2007)
1526	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	1999	I. persulcatus	EF469757	Tkachev et al. (2007)
1618	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	2000	I. persulcatus	EU443281	Tkachev et al. (2008)
Chl-3247-2005	Chelyabinsk region, Russia	2005	I. persulcatus	GU444175	Kovalev et al. (2009)
Chl-5570-2005	Chelyabinsk region, Russia	2005	I. persulcatus	GU444184	Kovalev et al. (2009)
Ekaterinburg-35-8-06	Ekaterinburg, Ural, Russia	2006	I. persulcatus	FJ214122	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-37-3-06	Ekaterinburg, Ural, Russia	2006	I. persulcatus	FJ214126	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-44-2-06	Ekaterinburg, Ural, Russia	2006	I. persulcatus	FJ214124	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-56-03	Ekaterinburg, Ural, Russia	2003	I. persulcatus	FJ214127	Karan et al. (2008)
Ekb-1031-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444262	Kovalev et al. (2009)
Ekb-110-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444259	Kovalev et al. (2009)
Ekb-11-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444249	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1149-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444269	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1151-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444270	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1153-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444271	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1160-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444272	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1163-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444273	Kovalev et al. (2009)
Ekb-118-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444260	Kovalev et al. (2009)
Ekb-12-13-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444197	Kovalev et al. (2009)
Ekb-12-16-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444198	Kovalev et al. (2009)
Ekb-12-17-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444199	Kovalev et al. (2009)
Ekb-12-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444250	Kovalev et al. (2009)
Ekb-125-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444261	Kovalev et al. (2009)
Ekb-13-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444251	Kovalev et al. (2009)
Ekb-13-23-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444201	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1365-1978	Sverdlovsk region, Russia	1978	I.persulcatus	GU444150	Kovalev et al. (2009)
Ekb-13-8-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444200	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1449-1969	Sverdlovsk region, Russia	1969	I.persulcatus	GU444151	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1524-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444126	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1627-1969	Sverdlovsk region, Russia	1969	I.persulcatus	GU444155	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1653-1969	Sverdlovsk region, Russia	1969	I.persulcatus	GU444130	Kovalev et al. (2009)
Ekb-17-7-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444202	Kovalev et al. (2009)
Ekb-182-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	Human blood	GU444282	Kovalev et al. (2009)
Ekb-183-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444241	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1842-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444214	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1874-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444215	Kovalev et al. (2009)
Ekb-193-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444226	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1987-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444221	Kovalev et al. (2009)
Ekb-200505-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444186	Kovalev et al. (2009)

Таблица. (продолжение)

Штамм	Место выделения	Год выделения	Источник выделения	№ доступа в GenBank	Ссылки
Ekb-2012-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444252	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2122-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444167	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2231-1969	Sverdlovsk region, Russia	1969	Human blood	GU444131	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2500-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444169	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2517-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444170	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2519-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444171	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2593-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444172	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2681-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444173	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2880-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444174	Kovalev et al. (2009)
Ekb-302-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444281	Kovalev et al. (2009)
Ekb-312-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444164	Kovalev et al. (2009)
Ekb-322-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444278	Kovalev et al. (2009)
Ekb-33-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444232	Kovalev et al. (2009)
Ekb-346-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444203	Kovalev et al. (2009)
Ekb-347-1978	Sverdlovsk region, Russia	1978	I.persulcatus	GU444157	Kovalev et al. (2009)
Ekb-3495-1984	Sverdlovsk region, Russia	1984	I.persulcatus	GU444128	Kovalev et al. (2009)
Ekb-357-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU339055	Kovalev et al. (2009)
Ekb-3590-1978	Sverdlovsk region, Russia	1978	Human blood	GU444133	Kovalev et al. (2009)
Ekb-3718-1977	Sverdlovsk region, Russia	1977	I.persulcatus	GU444134	Kovalev et al. (2009)
Ekb-37-1968	Sverdlovsk region, Russia	1968	I.persulcatus	GU444145	Kovalev et al. (2009)
Ekb-4083-1978	Sverdlovsk region, Russia	1978	I.persulcatus	GU444135	Kovalev et al. (2009)
Ekb-41-00	Sverdlovsk region, Russia	?	Unknown	GU444124	Kovalev et al. (2009)
Ekb-42-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444257	Kovalev et al. (2009)
Ekb-4458-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444176	Kovalev et al. (2009)
Ekb-4469-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444178	Kovalev et al. (2009)
Ekb-4630-1978	Sverdlovsk region, Russia	1978	Human blood	GU444125	Kovalev et al. (2009)
Ekb-5045-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444179	Kovalev et al. (2009)
Ekb-5191-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444180	Kovalev et al. (2009)
Ekb-5357-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444182	Kovalev et al. (2009)
Ekb-54-1 ENIIVI	Sverdlovsk region, Russia	?	Unknown	GU444123	Kovalev et al. (2009)
Ekb-54-2 ENIIVI	Sverdlovsk region, Russia	?	Unknown	GU444122	Kovalev et al. (2009)
Ekb-5465-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444188	Kovalev et al. (2009)
Ekb-55-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444258	Kovalev et al. (2009)
Ekb-5571-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444189	Kovalev et al. (2009)
Ekb-698-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444228	Kovalev et al. (2009)
Ekb-7-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444245	Kovalev et al. (2009)
Ekb-78-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444239	Kovalev et al. (2009)
Ekb-785-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444205	Kovalev et al. (2009)
Ekb-80-1969	Sverdlovsk region, Russia	1969	I.persulcatus	GU444154	Kovalev et al. (2009)
Ekb-8-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444246	Kovalev et al. (2009)
Ekb-862-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444165	Kovalev et al. (2009)
Ekb-867-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444229	Kovalev et al. (2009)
Ekb-885-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444166	Kovalev et al. (2009)
Ekb-888-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444208	Kovalev et al. (2009)
IR99-2f7	Irkutsk, Russia	1999	I. persulcatus	AB049352	Hayasaka et al. (2001)
IR99-2m7	Irkutsk, Russia	1999	I. persulcatus	AB049351	Hayasaka et al. (2001)
Kurgan-279-07	Kurgan, Ural, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214149	Karan et al. (2008)
Kurgan-280-07	Kurgan, Ural, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214152	Karan et al. (2008)
Kurgan-316-07	Kurgan, Ural, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214151	Karan et al. (2008)
Kurgan-371-07	Kurgan, Ural, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214150	Karan et al. (2008)
Tmn-252-2005	Tyumen region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444162	Kovalev et al. (2009)

Таблица. (продолжение)

Штамм	Место выделения	Год выделения	Источник выделения	№ доступа в GenBank	Ссылки
Tmn-3025-2008	Tyumen region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444274	Kovalev et al. (2009)
Tmn-3031-2008	Tyumen region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444275	Kovalev et al. (2009)
Tmn-3038-2008	Tyumen region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444276	Kovalev et al. (2009)
Tmn-3-2007	Tyumen region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444218	Kovalev et al. (2009)
Tmn-3282-2008	Tyumen region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444283	Kovalev et al. (2009)
Tmn-3313-2008	Tyumen region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444285	Kovalev et al. (2009)
Tmn-5-3-2007	Tyumen region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444242	Kovalev et al. (2009)
Z 22	Kemerovo, Siberia, Russia	2005	I. persulcatus	EF566816	Zoeller et al. (2007)
Zausaev	Novosibirsk, Russia	1985	Human brain	AF527415	Gritsun et al. (1993)
<b>Кластер В</b>					
Ekb-125-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	Human blood	GU444253	Kovalev et al. (2009)
Ekb-14-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444139	Kovalev et al. (2009)
Ekb-22-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444141	Kovalev et al. (2009)
Ekb-26-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444142	Kovalev et al. (2009)
Ekb-33-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444143	Kovalev et al. (2009)
Ekb-42-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444148	Kovalev et al. (2009)
Ekb-7-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444137	Kovalev et al. (2009)
Ekb-9-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444138	Kovalev et al. (2009)
<b>Кластер С</b>					
745	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	1992	I. persulcatus	EF470578	Tkachev et al. (2007)
Ekb-1032-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444263	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1038-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444264	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1039-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444265	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1040-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444266	Kovalev et al. (2009)
Ekb-20-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444140	Kovalev et al. (2009)
Ekb-34-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444144	Kovalev et al. (2009)
Ekb-40-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444146	Kovalev et al. (2009)
Ekb-41-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I.persulcatus	GU444147	Kovalev et al. (2009)
Ekb-432-1977	Sverdlovsk region, Russia	1977	I.persulcatus	GU444158	Kovalev et al. (2009)
Ekb-4591-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444192	Kovalev et al. (2009)
Ekb-532-1972	Sverdlovsk region, Russia	1972	Human blood	GU444159	Kovalev et al. (2009)
Z 6	Kemerovo, Siberia, Russia	2005	I. persulcatus	EF566817	Zoeller et al. (2007)
<b>Кластер D</b>					
Ekaterinburg-27-11-06	Ekaterinburg, Ural, Russia	2006	I. persulcatus	FJ214123	Karan et al. (2008)
Ekb-1656-1969	Sverdlovsk region, Russia	1969	I.persulcatus	GU444153	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1956-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444220	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2172-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444168	Kovalev et al. (2009)
Ekb-5-1-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444194	Kovalev et al. (2009)
Ekb-5444-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444183	Kovalev et al. (2009)
Ekb-788-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444206	Kovalev et al. (2009)
Ekb-9-2-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444195	Kovalev et al. (2009)
Est54	Estonia	2000	I. persulcatus	DQ393773	Golovljova et al. (2004)
Kurgan-264-07	Kurgan, Ural, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214130	Karan et al. (2008)
Kurgan-269-07	Kurgan, Ural, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214129	Karan et al. (2008)
Kurgan-272-07	Kurgan, Ural, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214128	Karan et al. (2008)
Kurgan-273-07	Kurgan, Ural, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214131	Karan et al. (2008)
Latvia 1-96	Latvia	2001	Human blood	AJ415565	Lundkvist et al. (2001)
Tmn-3258-2008	Tyumen region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444286	Kovalev et al. (2009)

Таблица. (продолжение)

Штамм	Место выделения	Год выделения	Источник выделения	№ доступа в GenBank	Ссылки
Tmn-9-2007	Tyumen region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444244	Kovalev et al. (2009)
Vologda-3-75	Vologda, northwestern region, Russia	1975	I. persulcatus	FJ214143	Karan et al. (2008)
Vologda-509-75	Vologda, northwestern region, Russia	1975	I. persulcatus	FJ214142	Karan et al. (2008)
Vologda-911-74	Vologda, northwestern region, Russia	1974	Human blood	FJ214138	Karan et al. (2008)
Yaroslavl-115-01	Yaroslavl, Central region, Russia	2001	I. persulcatus	FJ214145	Karan et al. (2008)
Yaroslavl-140-98	Yaroslavl, Central region, Russia	1998	I. persulcatus	FJ214146	Karan et al. (2008)
<b>Кластер Е</b>					
Ekb-1148-2-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444210	Kovalev et al. (2009)
Ekb-361-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444279	Kovalev et al. (2009)
Ekb-362-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444280	Kovalev et al. (2009)
Ekb-365-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444284	Kovalev et al. (2009)
<b>Кластер F</b>					
Ekb-16-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444222	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1906-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444219	Kovalev et al. (2009)
Ekb-19-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444230	Kovalev et al. (2009)
Ekb-254-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444163	Kovalev et al. (2009)
Ekb-26-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444231	Kovalev et al. (2009)
Ekb-275-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444190	Kovalev et al. (2009)
Ekb-32-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444254	Kovalev et al. (2009)
Ekb-34-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444255	Kovalev et al. (2009)
Ekb-35-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444256	Kovalev et al. (2009)
Ekb-44-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444235	Kovalev et al. (2009)
Ekb-5275-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444181	Kovalev et al. (2009)
Ekb-55-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444237	Kovalev et al. (2009)
Ekb-77-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444238	Kovalev et al. (2009)
Ekb-91 -2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	Human blood	GU444225	Kovalev et al. (2009)
Ekb-92-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444240	Kovalev et al. (2009)
Tmn-8-2007	Tyumen region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444243	Kovalev et al. (2009)
<b>Кластер G</b>					
Kokkola-102	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451295	Jaaskelainen (2005)
Kokkola-118	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451296	Jaaskelainen (2005)
Kokkola-39	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451290	Jaaskelainen (2005)
Kokkola-79	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451291	Jaaskelainen (2005)
Kokkola-8	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451286	Jaaskelainen (2005)
Kokkola-81	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451292	Jaaskelainen (2005)
Kokkola-86	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451294	Jaaskelainen (2005)
Kokkola-9	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451287	Jaaskelainen (2005)
<b>Кластер H</b>					
Aina	Irkutsk, Russia	1963	Human blood	AF091006	Ecker et al. (1999)
Irkutsk-112-79	Irkutsk, East Siberia, Russia	1979	I. persulcatus	FJ214156	Karan et al. (2008)
Vasilchenko	Novosibirsk, Russia	1969	Human blood	M97369	Gritsun et al. (1993)
Z 12	Kemerovo, Siberia, Russia	2005	I. persulcatus	EF566814	Zoeller et al. (2007)
Z 14	Kemerovo, Siberia, Russia	2005	I. persulcatus	EF566815	Zoeller et al. (2007)
Z 7	Kemerovo, Siberia, Russia	2005	I. persulcatus	EF566818	Zoeller et al. (2007)
<b>Уникальные штаммы и изоляты</b>					
668	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	1992	I. persulcatus	EU443260	Tkachev et al. (2008)

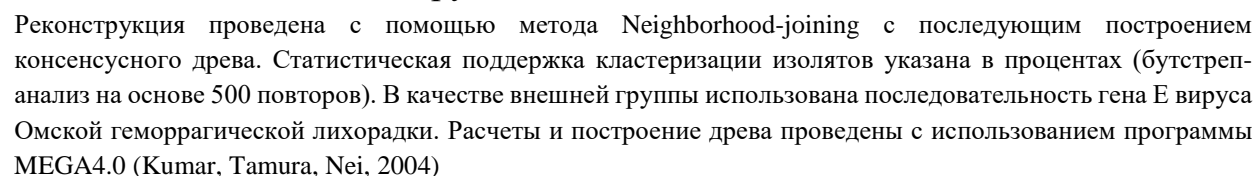


Таблица. (продолжение)

Штамм	Место выделения	Год выделения	Источник выделения	№ доступа в GenBank	Ссылки
Ekb-2490-1969	Sverdlovsk region, Russia	1969	Human blood	GU444132	Kovalev et al. (2009)
IR99-1m1	Irkutsk, Russia	1999	I. persulcatus	AB049348	Hayasaka et al. (2001)
Kemerovo-K34-67	Kemerovo, West Siberia, Russia	1967	Human blood	FJ214134	Karan et al. (2008)
Z 10	Kemerovo, Siberia, Russia	2005	I. persulcatus	EF566813	Zoeller et al. (2007)
Ekb-1715-1-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I. persulcatus	GU444212	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1715-2-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I. persulcatus	GU444213	Kovalev et al. (2009)
691	Western Siberia, Russia	1982	I. persulcatus	DQ394878	GenBank
691-1	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	1982	I. persulcatus	EU443264	Tkachev et al. (2008)
Ekb-324-1975	Sverdlovsk region, Russia	1975	I. persulcatus	GU444149	Kovalev et al. (2009)
Ekb-643-1978	Sverdlovsk region, Russia	1978	I. persulcatus	GU444160	Kovalev et al. (2009)
Kokkola-25	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451288	Jaaskelainen (2005)
Kokkola-26	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451289	Jaaskelainen (2005)
Ekb-1068-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I. persulcatus	GU444267	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1070-2008	Sverdlovsk region, Russia	2008	I. persulcatus	GU444268	Kovalev et al. (2009)
Vologda-14-06	Vologda, northwestern region, Russia	2006	I. persulcatus	FJ214140	Karan et al. (2008)
Vologda-15-06	Vologda, northwestern region, Russia	2006	I. persulcatus	FJ214141	Karan et al. (2008)
Vologda-4-06	Vologda, northwestern region, Russia	2006	I. persulcatus	FJ214139	Karan et al. (2008)
Ekb-4954-1984	Sverdlovsk region, Russia	1984	Human brain	GU444129	Kovalev et al. (2009)
IR99-1m4	Irkutsk, Russia	1999	I. persulcatus	AB049349	Hayasaka et al. (2001)
Ekb-4467-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I. persulcatus	GU444177	Kovalev et al. (2009)
Ekb-467-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I. persulcatus	GU444191	Kovalev et al. (2009)
EK328	Estonia	1972	I. persulcatus	DQ486861	Romanova et al. (2007)
Est3535	Estonia	2001	I. persulcatus	DQ393774	Golovljova et al. (2004)
1252	Moshkovo outskirts, Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	1982	I. persulcatus	DQ394879	Tkachev et al. (2006)
228	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	1981	I. persulcatus	EF467840	Tkachev et al. (2008)
499	Western Siberia, Russia	1982	I. persulcatus	DQ394877	GenBank
886-84	Irkutsk region, Russia	1984	C. rufocanus (wild rodents)	EF469662	Karan et al. (1999)
919	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	1994	I. persulcatus	EF469740	Tkachev et al. (2007)
Ekaterinburg-14-5-06	Ekaterinburg, Ural, Russia	2006	I. persulcatus	FJ214125	Karan et al. (2008)
Ekb-10-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I. persulcatus	GU444248	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1148-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I. persulcatus	GU444209	Kovalev et al. (2009)
Ekb-12-9-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I. persulcatus	GU444196	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1632-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I. persulcatus	GU444211	Kovalev et al. (2009)
Ekb-170604-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I. persulcatus	GU444185	Kovalev et al. (2009)
Ekb-17-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I. persulcatus	GU444223	Kovalev et al. (2009)
Ekb-1766-1977	Sverdlovsk region, Russia	1977	I. persulcatus	GU444152	Kovalev et al. (2009)
Ekb-200505-2-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I. persulcatus	GU444187	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2008-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I. persulcatus	GU444216	Kovalev et al. (2009)

Таблица. (продолжение)

Штамм	Место выделения	Год выделения	Источник выделения	№ доступа в GenBank	Ссылки
Ekb-256-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444227	Kovalev et al. (2009)
Ekb-2761-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444193	Kovalev et al. (2009)
Ekb-3102-1986	Sverdlovsk region, Russia	1986	I.persulcatus	GU444127	Kovalev et al. (2009)
Ekb-35-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444233	Kovalev et al. (2009)
Ekb-39-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444234	Kovalev et al. (2009)
Ekb-4338-1978	Sverdlovsk region, Russia	1978	I.persulcatus	GU444136	Kovalev et al. (2009)
Ekb-54-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444236	Kovalev et al. (2009)
Ekb-669-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444204	Kovalev et al. (2009)
Ekb-77-2005	Sverdlovsk region, Russia	2005	I.persulcatus	GU444161	Kovalev et al. (2009)
Ekb-837-2006	Sverdlovsk region, Russia	2006	I.persulcatus	GU444207	Kovalev et al. (2009)
Ekb-90 -2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	Human blood	GU444224	Kovalev et al. (2009)
Ekb-9-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	I.persulcatus	GU444247	Kovalev et al. (2009)
Ekb-Gorlin-2007	Sverdlovsk region, Russia	2007	Human brain	GU444217	Kovalev et al. (2009)
IR99-2f13	Irkutsk, Russia	1999	I.persulcatus	AB049353	Hayasaka et al. (2001)
IR99-2m3	Irkutsk, Russia	1999	I. persulcatus	AB049350	Hayasaka et al. (2001)
Kemerovo-8-11-05	Kemerovo, West Siberia, Russia	2005	I. persulcatus	FJ214135	Karan et al. (2008)
Kokkola-84	Finland	2006	I. persulcatus	DQ451293	Jaaskelainen (2005)
Volkhov-2-43	Volkhov, northwestern region, Russia	1943	I. ricinus	FJ214148	Karan et al. (2008)
Vologda-2	Vologda region, Russia	1990	I. persulcatus	AF229364	GenBank
Vologda-227-07	Vologda, northwestern region, Russia	2007	I. persulcatus	FJ214153	Karan et al. (2008)
Vologda-365-75	Vologda, northwestern region, Russia	1975	I. persulcatus	FJ214136	Karan et al. (2008)
Vologda-658-75	Vologda, northwestern region, Russia	1975	Human blood	FJ214137	Karan et al. (2008)
Yaroslavl-2-80	Yaroslavl, Central region, Russia	1980	I. persulcatus	FJ214144	Karan et al. (2008)
Tmn-3249-2008	Tyumen region, Russia	2008	I.persulcatus	GU444277	Kovalev et al. (2009)
Stolby-4	Krasnoyarsk region, Russia	1988	I.persulcatus	AF231807	GenBank



## ПРИЛОЖЕНИЕ IV

Таблица

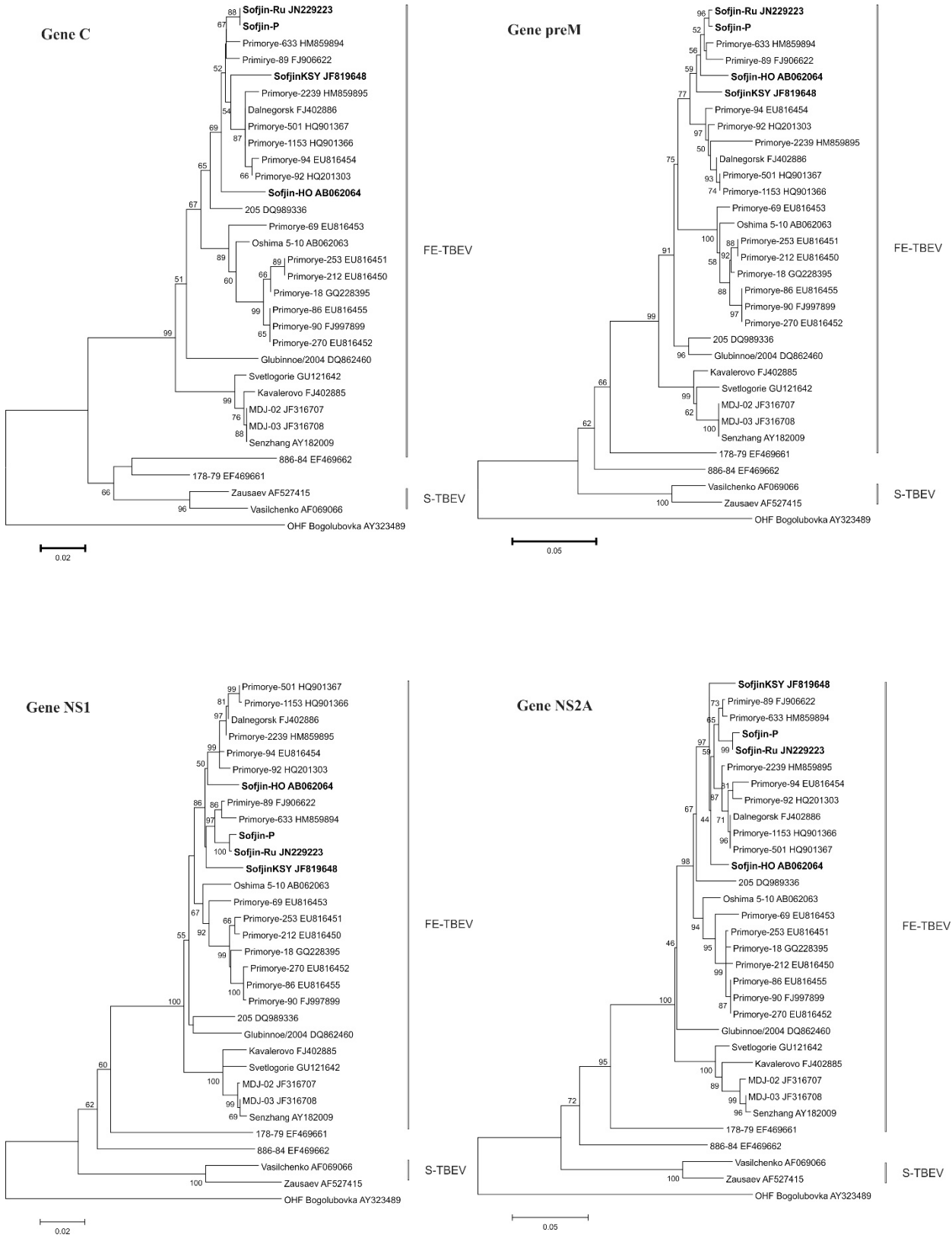
## Перечень штаммов ВКЭ-Дв, включенных в филогенетический анализ

Штамм	№ доступа в GenBank	Год выдел.	Источник выделения	Место выделения	Ссылки
Phateev	AY363848	1954	Мозг человека	Кемеровская область, Россия	Karan et al. (2003)
Yaroslavl-10	AY363853	1989	Клещ	Ярославская область, Россия	Karan et al. (2003)
Usen-1	EU072444	1986	Клещ	Башкортостан, Россия	Adelshin et al. (2007)
Nugush-3	EU072445	1986	<i>I. persulcatus</i>	Башкортостан, Россия	Adelshin et al. (2007)
StaraRussa	EU072446	1986	Клещ	Старая Русса, Новгородская область, Россия	Adelshin et al. (2007)
Oshima	AB001026	1993	Cerebrospinal fluid	Хокайдо, Япония	Takashima et al. (1997)
Oshima 5-11	AB022290	1995	Кровь собаки	Оshima, Япония	Hayasaka et al. (1999)
Oshima 3-6	AB022291	?	Кровь собаки	Хокайдо, Япония	Hayasaka et al. (1999)
O-I-1	AB022292	1996	<i>I. ovatus</i>	Япония	Hayasaka et al. (1999)
Oshima A-1	AB022293	1995	<i>A. speciosus</i>	Оshima, Япония	Hayasaka et al. (1999)
Oshima C-1	AB022294	1995	<i>C. rufocanus</i>	Оshima, Япония	Hayasaka et al. (1999)
KN98-2	AB022295	1998	<i>I. persulcatus</i>	Хабаровск, Дальний Восток Россия	Hayasaka et al. (1999)
KN98-5	AB022296	1998	<i>I. persulcatus</i>	Хабаровск, Дальний Восток Россия	Hayasaka et al. (1999)
KN98-10	AB022297	1998	<i>I. persulcatus</i>	Хабаровск, Дальний Восток Россия	Hayasaka et al. (1999)
VL99-m11	AB049345	1999	<i>I. persulcatus</i>	Владивосток, Россия	Hayasaka et al. (2001)
KN99-m9	AB049346	1999	<i>I. persulcatus</i>	Хабаровск, Дальний Восток Россия	Hayasaka et al. (2001)
D1283	AB049347	1998	Мозг человека	Хабаровск, Дальний Восток Россия	Hayasaka et al. (2001)
Oshima 5-10	AB062063	1995	Кровь собаки	Оshima, Япония	Hayasaka et al. (1999)
Sofjin-HO	AB062064	?			Goto et al. (2001)
Miz416/97	AB237184	1997	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Yoshizumi et al. (2005)
Kam586/97	AB237185	1997	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Yoshizumi et al. (2005)
Kam588/97	AB237186	1997	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Yoshizumi et al. (2005)
Kik629/97	AB237187	1997	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Hayasaka et al. (1999)
Miz660/97	AB237188	1997	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Yoshizumi et al. (2005)
Oh696/97	AB237189	1997	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Yoshizumi et al. (2005)
Oh698/97	AB237190	1997	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Yoshizumi et al. (2005)
Oh701/97	AB237191	1997	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Yoshizumi et al. (2005)
Kita987/99	AB237192	1999	<i>C. rufocanus</i>	Хокайдо, Япония	Yoshizumi et al. (2005)
Crimea	AF091008	1987	<i>I. ricinus</i>	Крым, Украина	Ecker et al. (1999)
N132	AF091013	1979	<i>I. persulcatus</i>	Владивосток, Россия	Ecker et al. (1999)
RK1424	AF091016	1977	<i>I. persulcatus</i>	Латвия	Ecker et al. (1999)
T-blood	AF091019	1939	Кровь человека	Пермь, Россия	Ecker et al. (1999)
Hehcir	AF229363	1985	<i>I. persulcatus</i>	Хабаровский край, Россия	Zlobin et al. (2000)
Koltsovo-1	AF540029	?	Мозг человека	Новосибирская обл., Россия	Ternovoi et al. (2003)
Koltsovo-19	AF540030	1999	Мозг человека	Новосибирская обл., Россия	Ternovoi et al. (2003)
Koltsovo-23	AF540031	?	Мозг человека	Новосибирская обл., Россия	Ternovoi et al. (2003)
Koltsovo-29	AF540032	1999	Мозг человека	Новосибирская обл., Россия	Ternovoi et al. (2003)
Koltsovo-30	AF540033	?	Мозг человека	Новосибирская обл., Россия	Ternovoi et al. (2003)
Koltsovo-31	AF540034	?	Мозг человека	Новосибирская обл., Россия	Ternovoi et al. (2003)
Primorye-211	AY168772	?	Кровь человека	Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)
Primorye-332	AY169390	?		Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)

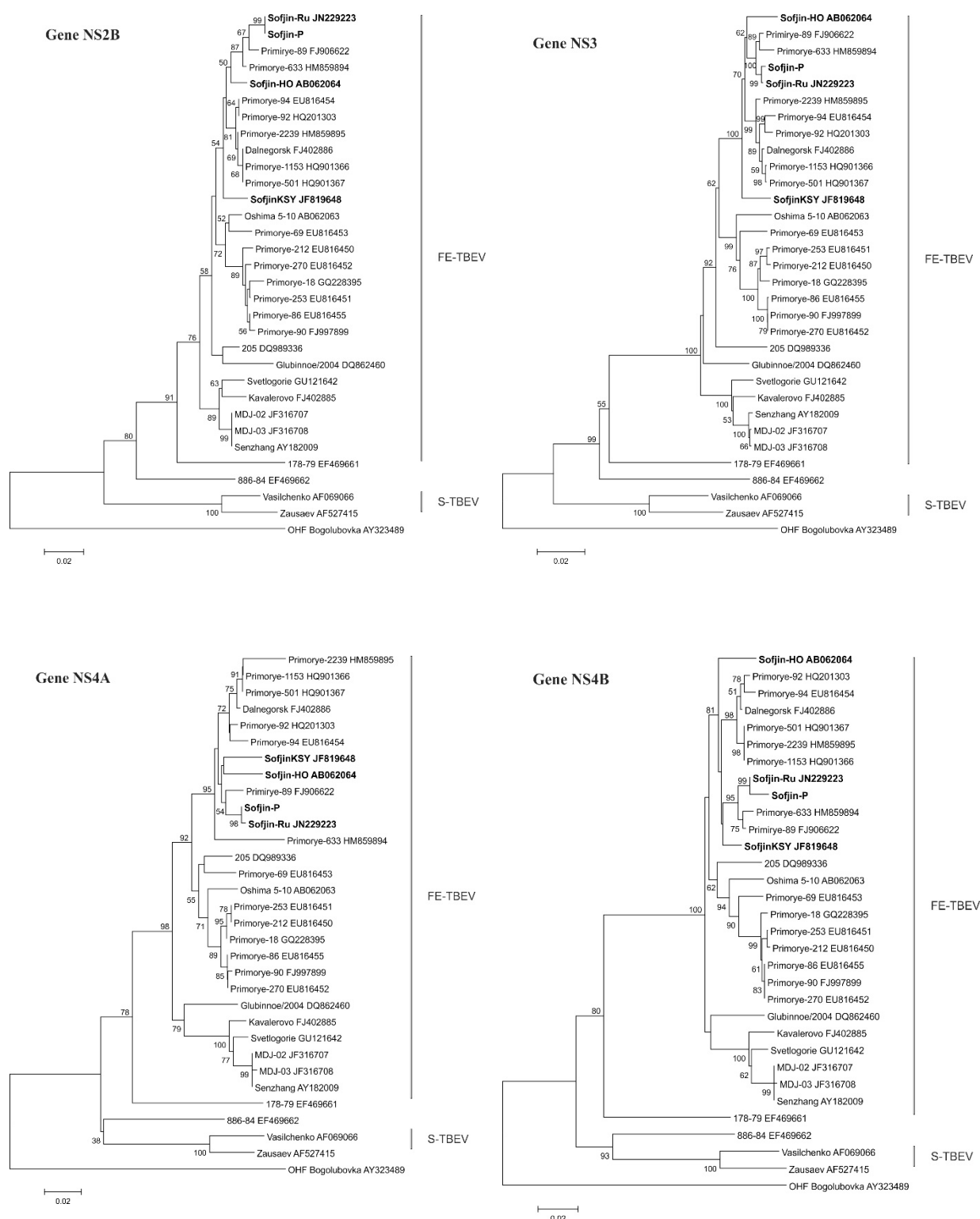
Штамм	№ доступа в GenBank	Год выдел.	Источник выделения	Место выделения	Ссылки
Primorye-196	AY169391	?	Кровь человека	Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)
Primorye-437	AY169392	?	Кровь человека	Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)
Primorye-Sinolizin	AY169393	?	Кровь человека	Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)
Primorye-Babich	AY169394	?	Кровь человека	Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)
Primorye-Chugurin	AY169395	?	Мозг человека	Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)
Primorye-Sheinin	AY169396	?	Мозг человека	Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)
Primorye-368	AY169397	?	Кровь человека	Приморский край, Россия	Kulakova et al. (2002)
Senzhang	AY174188	1953	Неизвестно	Китай	Si et al. (2002)
DXAL5	AY178833	?	Неизвестно	Северо-восточный Китай	Chen et al. (2002)
MDJ-01	AY217093	?	Неизвестно	Китай	Ma et al. (2003)
Khabarovsk-17	AY363846	1957	Мозг человека	Хабаровский край, Россия	Karan et al. (2003)
Vinokurov	AY363856	1959	Кровь человека	Свердловская область, Россия	Karan et al. (2003)
Est2546	DQ393779	1996	A. agrarius	Эстония	Golovljova et al. (2004)
P-69	DQ667007	2000	Кровь человека	Приморский край, Россия	Leonova et al. (2007)
P-73	DQ667008	1973	Мозг человека	Приморский край, Россия	Leonova et al. (2007)
P-202	DQ667009	1997	Кровь человека	Приморский край, Россия	Leonova et al. (2007)
Glubinnoe/2004	DQ862460	2004	Мозг человека	Приморский край, Россия	Ternovoi et al. (2006)
205	DQ989336	1973	I. persulcatus	Приморский край, Россия	Safronov et al. (1990)
Ural2005-3	EF029053	2005	I. persulcatus	Урал, Россия	Tkachev et al. (2006)
178-79	EF469661	1979	мозг мыши	Иркутская область, Россия	Karan et al. (1999)
Sebezsh	EU072447	1986	Клещ	Себеж, Псковская область, Россия	Adelshin et al. (2007)
DXAL-13	EU089976	?	мозг мыши	Северо-западный Китай	Chen et al. (2007)
DXAL-12	EU089977	?	мозг мыши	Северо-западный Китай	Chen et al. (2007)
DXAL-16	EU089978	?	мозг мыши	Северо-западный Китай	Chen et al. (2007)
DXAL-18	EU089979	?	мозг мыши	Северо-западный Китай	Chen et al. (2007)
DXAL-21	EU089980	?	мозг мыши	Северо-западный Китай	Chen et al. (2007)
Primorye-212	EU816450	1991	Кровь человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2008)
Primorye-253	EU816451	1991	Кровь человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2008)
Primorye-270	EU816452	1991	Кровь человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2008)
Primorye-69	EU816453	2000	Кровь человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2008)
Primorye-94	EU816454	1994	Кровь человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2008)
Primorye-86	EU816455	1986	Мозг человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2008)
Khabarovsk-Obor-4	FJ214111	1937	Мозг человека	Хабаровск, Дальний Восток, Россия	Karan et al. (2008)
Ural-Troynik	FJ214112	1941	Кровь человека	Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Ural-Yulya	FJ214113	1943	Кровь человека	Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Volkhov-Khromov	FJ214114	1943	Кровь человека	Волхов, Северо-западный регион, Россия	Karan et al. (2008)
Ural-Antipov	FJ214115	1942	Кровь человека	Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Ural-Ivanova	FJ214116	1942	Кровь человека	Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Ural-Belyaeva	FJ214117	1943	Кровь человека	Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Ural-Ponomarev	FJ214118	1942	Кровь человека	Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Ural-Nina	FJ214119	1943	Кровь человека	Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-Vinokurov	FJ214120	1959	Кровь человека	Екатеринбург, Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-Bersenev	FJ214121	1960	Кровь человека	Екатеринбург, Урал, Россия	Karan et al. (2008)
Kemerovo-Phateev	FJ214132	1954	Кровь человека	Кемерово, Западная Сибирь, Россия	Karan et al. (2008)

Штамм	№ доступа в GenBank	Год выдел.	Источник выделения	Место выделения	Ссылки
Kemerovo-YuB-40-67	FJ214133	1967	Кровь человека	Кемерово, Западная Сибирь, Россия	Karan et al. (2008)
Yaroslavl-10-89	FJ214147	1989	<i>I. persulcatus</i>	Ярославль, Центральный регион, Россия	Karan et al. (2008)
Irkutsk-48-06	FJ214157	2006	<i>Microtus oeconomus</i>	Иркутск, Восточная Сибирь, Россия	Karan et al. (2008)
Novosibirsk-11416	FJ214158	1991	Неизвестно	Новосибирск, Западная Сибирь, Россия	Karan et al. (2008)
Kavalerovo	FJ402885	1985	Мозг человека	Кавалерово, Приморский край, Россия	Belikov et al. (2008)
Dalnégorsk	FJ402886	1973	Мозг человека	Дальнегорск, Приморский край, Россия	Belikov et al. (2008)
Primirye-89	FJ906622	1987	Мозг человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2009)
Primorye-90	FJ997899	1990	Мозг человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2009)
Primorye-18	GQ228395	1997	Кровь человека	Приморский край, Россия	Belikov et al. (2009)
Sofjin	X07755	1937	Мозг человека	Приморский край, Россия	Yamshchikov and Pletnev (1988)
80k	GU121965	1970	Кровь человека	Свердловская область, Россия	Kozlovskaya et al. (2009)
Ekb100-2007	NM008973	2007	<i>I. persulcatus</i>	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb101-2007	NM008974	2007	<i>I. persulcatus</i>	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb54-1968	NM008985	1968	Кровь человека	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb4072-1966	NM008979	1966	Кровь человека	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb183-1973	NM008976	1973	Кровь человека	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb187-1969	NM008982	1969	<i>I. persulcatus</i>	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb295-1975	NM008977	1975	<i>I. persulcatus</i>	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb5118-1985	NM008980	1985	Кровь человека	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb5127-1985	NM008983	1985	<i>I. persulcatus</i>	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb5308-1978	NM008984	1978	Кровь человека	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb4100-1978	NM008981	1978	Кровь человека	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb73-1978	NM008978	1978	<i>I. persulcatus</i>	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)
Ekb162-1977	NM008975	1977	<i>I. persulcatus</i>	Свердловская область, Россия	Kovalev et al. (2010)

ПРИЛОЖЕНИЕ V



# ПРИЛОЖЕНИЕ V (продолжение)



**Рисунок.** Филогенетические деревья, построенные на основе ВКЭ-Дв нуклеотидных последовательностей генов двух структурных (С, ргеМ) и шести неструктурных белков (NS1, NS2а, NS2b, NS3, NS4а and NS4b) с использованием Neighbor-Joining метода. Статистическая поддержка показана в процентах (бутстреп анализ - 1000 реплик). Нуклеотидные последовательности вируса ОГЛ были взяты в качестве внешней группы.



# ПРИЛОЖЕНИЕ VI

Таблица

## Кластероны и уникальные штаммы ВКЭ

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Dalnégorsk	FJ402886	1A	1973	Human brain	Dalnégorsk, Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2008)
DXAL-16	EU089978	1A	?	mouse brain	North-eastern China	Chen et al. (2007)
DXAL-18	EU089979	1A	?	mouse brain	North-eastern China	Chen et al. (2007)
Glubinnoe/2004	DQ862460	1A	2004	Human brain	Primorsky krai, Russia	Ternovoi et al. (2006)
Kavalerovo	FJ402885	1A	1985	Human brain	Kavalerovo, Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2008)
KN98-10	AB022297	1A	1998	I. persulcatus	Khabarovsk, Far-Eastern Russia	Hayasaka et al. (1999)
KN98-2	AB022295	1A	1998	I. persulcatus	Khabarovsk, Far-Eastern Russia	Hayasaka et al. (1999)
KN99-m9	AB049346	1A	1999	I. persulcatus	Khabarovsk, Far-Eastern Russia	Hayasaka et al. (2001)
Kik629/97	AB237187	1A	1997	C. rufocanus	Hokkaido, Japan	Hayasaka et al. (1999)
Kiparis-94	JQ825146	1A	1994	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Kita987/99	AB237192	1A	1999	C. rufocanus	Hokkaido, Japan	Yoshizumi et al. (2005)
Miz416/97	AB237184	1A	1997	C. rufocanus	Hokkaido, Japan	Yoshizumi et al. (2005)
Miz660/97	AB237188	1A	1997	C. rufocanus	Hokkaido, Japan	Yoshizumi et al. (2005)
Oh698/97	AB237190	1A	1997	C. rufocanus	Hokkaido, Japan	Yoshizumi et al. (2005)
Oh701/97	AB237191	1A	1997	C. rufocanus	Hokkaido, Japan	Yoshizumi et al. (2005)
O-I-1	AB022292	1A	1996	I. ovatus	Japan	Hayasaka et al. (1999)
Oshima 08-As	AB753012	1A	2008	Apodemus speciosus	Japan: Hokkaido, Hokuto	Yoshii et al. (2012)
Oshima 3-6	AB022291	1A	?	Dog blood	Hokkaido, Japan	Hayasaka et al. (1999)
Oshima 5-10	AB001026	1A	1993	Cerebrospinal fluid	Hokkaido, Japan	Takashima et al. (1997)
Oshima 5-10	AB062063	1A	1995	Dog blood	Oshima, Japan	Hayasaka et al. (1999)
Oshima C-1	AB022294	1A	1995	C. rufocanus	Oshima, Japan	Hayasaka et al. (1999)
P-202	DQ667009	1A	1997	Human blood	Primorsky krai, Russia	Leonova et al. (2007)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
P-69	DQ667007	1A	2000	Human blood	Primorsky krai, Russia	Leonova et al. (2007)
P-73	DQ667008	1A	1973	Human brain	Primorsky krai, Russia	Leonova et al. (2007)
Primorye-18	GQ228395	1A	1997	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2009)
Primorye-183	JQ825153	1A	1991	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-202	JQ825157	1A	1997	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-208	JQ825158	1A	1991	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-212	EU816450	1A	1991	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2008)
Primorye-2239	HM859895	1A	1985	?	Primorsky krai, Russia	Chausov et al. (2010)
Primorye-253	EU816451	1A	1991	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2008)
Primorye-320	JQ825160	1A	1999	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-332	AY169390	1A	1991	Human blood	Primorsky krai, Russia	Kulakova et al. (2002)
Primorye-437	JQ825162	1A	1999	Human blood	Russia: Russian Far East	Belikov et al. (2012)
Primorye-69	EU816453	1A	2000	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2008)
Primorye-739	JQ825156	1A	1992	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-82	JQ825148	1A	1982	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-86	EU816455	1A	1986	Human brain	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2008)
Primorye-87	JQ825149	1A	1987	Human brain	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-89	FJ906622	1A	1987	Human brain	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2009)
Primorye-895	JQ825145	1A	2000	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-91	JQ825150	1A	1991	Human brain	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-92	HQ201303	1A	1992	brain of patient	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2010)
Shkotovo-94	JQ825147	1A	1994	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
SofjinKGG	GU121963	1A	1937	Human brain	Primorsky krai, Russia	Kozlovskaya et al. (2009)
Spassk-72	JQ825151	1A	1972	Human brain	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Svetlogorie	GU121642	1A	2008	Human brain	Svetlogorie, Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2010)
T-blood	AF091019	1A	1939	Human blood	Perm, Russia	Ecker et al. (1999)
Ural-Antipov	FJ214115	1A	1942	Human blood	Ural region, Russia	Karan et al. (2008)
Ural-Belyaeva	FJ214117	1A	1943	Human blood	Ural region, Russia	Karan et al. (2008)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ural-Ivanova	FJ214116	1A	1942	Human blood	Ural region, Russia	Karan et al. (2008)
Ural-Nina	FJ214119	1A	1943	blood of patient	Ural region, Russia	Karan et al. (2008)
Ural-Ponomarev	FJ214118	1A	1942	Human blood	Ural region, Russia	Karan et al. (2008)
Ural-Troynik	FJ214112	1A	1941	blood of patient	Ural region, Russia	Karan et al. (2008)
Ural-Yulya	FJ214113	1A	1943	liquor of patient	Ural region, Russia	Karan et al. (2008)
VL99-m11	AB049345	1A	1999	I. persulcatus	Vladivostok, Russia	Hayasaka et al. (2001)
Volkhov-Khromov	FJ214114	1A	1943	blood of patient	Volkhov, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Xinjiang-01	JX534167	1A	2012	I. persulcatus	China, Xinjiang, Northwestern China	Liu et al. (2012)
Zabaikalye 30-00	KC422667	1A	2000	Human brain	Zabaikalye, Russia	Adelshin et al. (2012)
Zabaikalye 50-03	KC422666	1A	2003	Tamias sibiricus	Zabaikalye, Russia	Adelshin et al. (2012)
Zabaikalye 64-00	KC422664	1A	2000	Microtus maximowiczii ungurensis	Zabaikalye, Russia	Adelshin et al. (2012)
Zabaikalye 67-99	KC422665	1A	1999	D. silvarum	Zabaikalye, Russia	Adelshin et al. (2012)
Zabaikalye-1-98	JX968560	1A	1998	Human blood	Zabaikalye, Russia	Adelshin et al. (2012)
Zabaikalye-1-98	JX968560	1A	1998	Homo sapiens	Russia, Zabaikalye	Adelshin et al. (2012)
80k	GU121965	1B	1970	Human blood	Sverdlovsk region, Urals, Russia	Kozlovskaya et al. (2009)
Ekb4072-1966	HM008979	1B	1966	Human blood	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb4072-1966	HM008979	1B	1966	Human blood	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Irkutsk-48-06	FJ214157	1B	2006	Microtus oeconomus	Irkutsk, East Siberia, Russia	Karan et al. (2008)
Kemerovo-Phateev	FJ214132	1B	1954	blood of patient	Kemerovo, West Siberia, Russia	Karan et al. (2008)
Kemerovo-YuB-40-67	FJ214133	1B	1967	Human blood	Kemerovo, West Siberia, Russia	Karan et al. (2008)
Khabarovsk-Obor-4	FJ214111	1B	1937	Human brain	Khabarovsk, Far East, Russia	Karan et al. (2008)
Novosibirsk-11416	FJ214158	1B	1991	?	Novosibirsk, West Siberia, Russia	Karan et al. (2008)
Sofjin-Chumakov	KC806252	1B	1937	Human brain	Primorsky kraj, Russia	Vorovich et al. (2013)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Sofjin-HO	AB062064	1B	?		Khabarovskiy kray, Far-East, Russia	Goto et al. (2001)
SofjinKSY	JF819648	1B	1937	Human blood	Primorsky kraj, Russia	Kovalev et al. (2012)
205	DQ989336	1C	1973	I. persulcatus	Primorsky kraj, Russia	Safronov et al. (1990)
205	JX498939	1C	1973	I. persulcatus	Primorsky kraj, Russia	Chausov et al. (2012)
205KGG	GU121964	1C	1973	I. persulcatus	Khabarovskiy kray, Far-East, Russia	Kozlovskaya et al. (2009)
D1283	AB049347	1C	1998	Human brain	Khabarovsk, Far-Eastern Russia	Hayasaka et al. (2001)
PK-36	GU121967	1C	1982	I. persulcatus	Primorsky kray, Far-East, Russia	Kozlovskaya et al. (2009)
Primorye-196	JQ825155	1C	2000	Human blood	Russia: Russian Far East	Belikov et al. (2012)
Primorye-52	JQ825154	1C	1999	Human blood	Primorsky kraj, Russia	Belikov et al. (2012)
Ekb100-2007	HM008973	1D	2007	I. persulcatus	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb100-2007	HM008973	1D	2007	I. persulcatus	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb101-2007	HM008974	1D	2007	I. persulcatus	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb101-2007	HM008974	1D	2007	I. persulcatus	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
N132	AF091013	1D	1979	I. persulcatus	Vladivostok, Russia	Ecker et al. (1999)
Ekb187-1969	HM008982	1E	1969	I. persulcatus	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb187-1969	HM008982	1E	1969	I. persulcatus	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb4100-1978	HM008981	1E	1978	Human blood	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb4100-1978	HM008981	1E	1978	Human blood	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb5127-1985	HM008983	1E	1985	I. persulcatus	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb5127-1985	HM008983	1E	1985	I. persulcatus	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb5308-1978	HM008984	1E	1978	Human blood	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb5308-1978	HM008984	1E	1978	Human blood	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb54-1968	HM008985	1E	1968	Human blood	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb54-1968	HM008985	1E	1968	Human blood	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb183-1973	HM008976	1F	1973	Human blood	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb183-1973	HM008976	1F	1973	Human blood	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb295-1975	HM008977	1F	1975	I. persulcatus	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb295-1975	HM008977	1F	1975	I. persulcatus	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb73-1978	HM0008978	1F	1978	I.persulcatus	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb73-1978	HM0008978	1F	1978	I.persulcatus	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Kam586/97	AB237185	1G	1997	C. rufocanus	Hokkaido, Japan	Yoshizumi et al. (2005)
Kam588/97	AB237186	1G	1997	C. rufocanus	Hokkaido, Japan	Yoshizumi et al. (2005)
Crimea	AF091008	1H	1987	I. ricinus	Crimea, Ukraine Крым	Ecker et al. (1999)
Primorye-270	EU816452	1H	1991	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2008)
Primorye-274	JQ825159	1H	1999	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-345	JQ825161	1H	1999	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-75	JQ825152	1H	1999	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-750	JQ825163	1H	1998	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-823	JQ825164	1H	2000	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
Primorye-828	JQ825144	1H	1998	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2012)
DXAL5	AY178833	1I	?	Unknown	North-eastern China	Chen et al. (2002)
MDJ-02	JF316707	1I	2010	Human blood	China: Mudanjiang	Zhang et al. (2011)
Ekaterinburg- Bersenev	FJ214121	1J	1960	blood of patient	Ekaterinburg, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg- Vinokurov	FJ214120	1J	1959	blood of patient	Ekaterinburg, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Est2546	DQ393779	1K	1996	A. agrarius	Estonia	Golovljova et al. (2004)
Sofjin	JX498940	1K	?			Chausov et al. (2012)
Sofjin	X07755	1K	1937	Human brain	Primorsky krai, Russia	Yamshchikov and Pletnev (1988)
Sofjin-Ru	JN229223	1K	?	?	?	Morozov et al. (2011)
178-79	EF469661	1Unique	1979	mouse brain	Irkutsk region, Russia	Karan et al. (1999)
DV 936k	GU125722	1Unique	1975	ticks H. concina	Primorsky kray, Far-East, Russia	Kozlovskaya et al. (2009)
DXAL-12	EU089977	1Unique	?	mouse brain	North-eastern China	Chen et al. (2007)
DXAL-13	EU089976	1Unique	?	mouse brain	North-eastern China	Chen et al. (2007)
DXAL-21	EU089980	1Unique	?	mouse brain	North-eastern China	Chen et al. (2007)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb162-1977	HM008975	1Unique	1977	I.persulcatus	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Ekb162-1977	HM008975	1Unique	1977	I.persulcatus	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb5118-1985	HM008980	1Unique	1985	Human blood	Russia, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2010)
Ekb5118-1985	HM008980	1Unique	1985	Human blood	Sverdlovsk region, Russia	Kovalev et al. (2010)
Irkutsk-1861	JN003205	1Unique	2008	Homo sapiens	Russia	Kulakova et al. (2011)
KH98-5	AB022296	1Unique	1998	I. persulcatus	Khabarovsk, Far-Eastern Russia	Hayasaka et al. (1999)
MDJ-01	AY217093	1Unique	?	?	China	Ma et al. (2003)
MDJ-03	JF316708	1Unique	2010	Human blood	China: Mudanjiang	Zhang et al. (2011)
Oh696/97	AB237189	1Unique	1997	C. rufoanus	Hokkaido, Japan	Yoshizumi et al. (2005)
Oshima 5-11	AB022290	1Unique	1995	Dog blood	Oshima, Japan	Hayasaka et al. (1999)
Oshima A-1	AB022293	1Unique	1995	A. speciosus	Oshima, Japan	Hayasaka et al. (1999)
Primorye-1153	HQ901366	1Unique	2009	Human blood	Russia	Chausov et al. (2011)
Primorye-501	HQ901367	1Unique	2010	Human blood	Russia	Chausov et al. (2011)
Primorye-633	HM859894	1Unique	1978	?	Russia	Chausov et al. (2010)
Primorye-90	FJ997899	1Unique	1990	Human brain	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2009)
Primorye-94	EU816454	1Unique	1994	Human blood	Primorsky krai, Russia	Belikov et al. (2008)
RK1424	AF091016	1Unique	1977	I. persulcatus	Latvia	Ecker et al. (1999)
Senzhang	AY174188	1Unique	1953	Human brain	China	Si et al. (2002)
Senzhang	AY182009	1Unique	1953	Human brain	China	Ma et al. (2002)
TBEV-MN-2008	HM133639	1Unique	2008	brain tissue	Mongolia	Khasnatinov et al. (2010)
1015	JF501441	2A	2002	I. ricinus	Czech Republic: Borovany, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
120	XXXXXXX*	2A	1988	D.marginatus	Ukraine	Yurchenko et al. (2013)
150	XXXXXXX*	2A	1990	D.marginatus	Ukraine	Yurchenko et al. (2013)
166	EF113079	2A	2006	I. hexagonus	Czech Republic	Ruzek et al. (2006)
200	JF501437	2A	2000	I. ricinus	Czech Republic: Borovany, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
235	EF113081	2A	2006	Unknown	Czech Republic	Ruzek et al. (2006)
263	TEU27491	2A	1987	I. ricinus	Czech Republic	Wallner et al. (1995)
274	EF113083	2A	2006	Unknown	Czech Republic	Ruzek et al. (2006)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
290	XXXXXXX*	2A	1990	H.marginatum	Ukraine	Yurchenko et al. (2013)
340	JF501404	2A	1967	I. ricinus	Czech Republic: Potepli, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
39	JF501403	2A	1966	I. ricinus	Czech Republic: Potepli, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
398	JF501400	2A	1963	I. ricinus	Czech Republic: Potepli, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
399	JF501401	2A	1963	I. ricinus	Czech Republic: Potepli, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
40	JF501402	2A	1966	I. ricinus	Czech Republic: Potepli, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
414	JF501399	2A	1954	I. ricinus	Czech Republic: Potepli, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
433	EF116596	2A	2006	Unknown	Czech Republic	Ruzek et al. (2006)
465	JF501405	2A	1967	squirrel	Czech Republic: Potepli, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
679	JF501439	2A	2001	I. ricinus	Czech Republic: Borovany, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
70	XXXXXXX*	2A	1989	D.marginatus	Ukraine	Yurchenko et al. (2013)
76	JF501410	2A	1986	I. ricinus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
798	JF501440	2A	2001	I. ricinus	Czech Republic: Rimov, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
80	XXXXXXX*	2A	1989	I. ricinus	Ukraine	Yurchenko et al. (2013)
84.2	HM120875	2A	?	acarid	Russia: Altay	Tikhomirov et al. (2010)
85	XXXXXXX*	2A	1989	I. ricinus	Ukraine	Yurchenko et al. (2013)
9001	JF501407	2A	1978	I. ricinus	Czech Republic: Stechovice, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
9025	JF501408	2A	1978	I. ricinus	Czech Republic: Stechovice, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
A104	KF151173	2A	1990	Apodemus flavicollis	Austria	Pfeffer et al. (2013)
AB_432_11	KC154189	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Asbach	Frey et al. (2012)
Absettarov	AF091005	2A	1951	Human blood	St. Petersburg region, Russia	Ecker et al. (1999)
AG Brittnau1	HM468123	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
AG Brittnau3	HM468125	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
AG Brittnau4	HM468126	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
AG Brittnau5	HM468127	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
AG Gipf-Oberfrick	HM468128	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
AG Zofingen1	HM468129	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
AG Zofingen2	HM468130	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
Als. I	AF091007	2A	1975	I. ricinus	Alsace, France	Ecker et al. (1999)
BE Belp	HM468131	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Erlenbach i.S.1	HM468132	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Erlenbach i.S.2	HM468133	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Erlenbach i.S.3	HM468134	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Erlenbach i.S.4	HM468135	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Reichenbach i.K.1	HM468136	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Reichenbach i.K.2	HM468137	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Spiez Auwald	HM468138	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Spiez Rustwald1	HM468139	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Spiez Rustwald2	HM468140	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
BE Thun	HM468141	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
Bul_175_10	KC154175	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Burglengenfeld	Frey et al. (2012)
Bul_176_10	KC154176	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Burglengenfeld	Frey et al. (2012)
Bul_178_10	KC154177	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Burglengenfeld	Frey et al. (2012)
Bul_179_10	KC154178	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Burglengenfeld	Frey et al. (2012)
Bul_185_10	KC154180	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Burglengenfeld	Frey et al. (2012)
Bul_186_10	KC154179	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Burglengenfeld	Frey et al. (2012)
BUL393	JF501443	2A	2009	I. ricinus	Germany: Burglengenfeld, South East Germany	Weidmann et al. (2011)



Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
BUL399	JF501444	2A	2009	I. ricinus	Germany: Burglengenfeld, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
CZ-407	JF501419	2A	1988	I. ricinus	Czech Republic: Libava, North Moravia	Weidmann et al. (2011)
Cz-408	JF501420	2A	1988	I. ricinus	Czech Republic: Libava, North Moravia	Weidmann et al. (2011)
Est3051	DQ393775	2A	1996	I. ricinus	Estonia	Golovljova et al. (2004)
Est3053	DQ393777	2A	1996	I. ricinus	Estonia	Golovljova et al. (2004)
Est3509	DQ393778	2A	2001	I. ricinus	Estonia	Golovljova et al. (2004)
FS572	JF501445	2A	2009	I. ricinus	Germany: Fuerstenstein, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
H-48	JQ654655	2A	2002	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-51	JQ654658	2A	2003	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-52	JQ654659	2A	2003	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-55	JQ654662	2A	2007	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-64	JQ654660	2A	2010	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
HB_171_11	KC154185	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Heselbach	Frey et al. (2012)
HB_184_11	KC154195	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Heselbach	Frey et al. (2012)
HM_11_11	KC154182	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM_148_10	KC154173	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM_153_10	KC154174	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM_17_11	KC154183	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM_219_10	KC154181	2A	2010	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM_305_11	KC154186	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM_329_11	KC154187	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM_377_11	KC154188	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM_91_11	KC154184	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Haselmuehl	Frey et al. (2012)
HM467	JF501446	2A	2009	I. ricinus	Germany: Haselmuehl, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
HM474	JF501447	2A	2009	I. ricinus	Germany: Haselmuehl, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
HM475	JF501448	2A	2009	I. ricinus	Germany: Haselmuehl, South East Germany	Weidmann et al. (2011)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
HM483	JF501449	2A	2009	I. ricinus	Germany: Haselmuehl, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
HM498	JF501450	2A	2009	I. ricinus	Germany: Haselmuehl, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
HM554	JF501451	2A	2009	I. ricinus	Germany: Haselmuehl, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
HM666	JF501452	2A	2009	I. ricinus	Germany: Haselmuehl, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
HM685	JF501453	2A	2009	I. ricinus	Germany: Haselmuehl, South East Germany	Weidmann et al. (2011)
Irkutsk-118-71	FJ214154	2A	1971	Citellus undulatus	Irkutsk, East Siberia, Russia	Karan et al. (2008)
Irkutsk-134-71	FJ214155	2A	1971	Citellus undulatus	Irkutsk, East Siberia, Russia	Karan et al. (2008)
Iso 40	AF091009	2A	1975	I. ricinus	Schaffhausen, Switzerland	Ecker et al. (1999)
Isosaari-5	HM051169	2A	2005	Ixodes ricinus	Finland	Jaaskelainen et al. (2010)
Kumlinge 25-03	GU183379	2A	2003	I. ricinus	Finland	Uzcategui et al. (2012)
Kumlinge A 52	AY268437	2A	1959	I. ricinus	Kumlinge, Finland	Jaaskelainen et al. (2003)
Kumlinge_A52	GU183380	2A	1959	I. ricinus	Finland	Uzcategui et al. (2012)
Latvia-11686	AJ319582	2A	2001	Human blood	Latvia	Lundkvist et al. (2001)
Latvia-12718	AJ319586	2A	2001	Human blood	Latvia	Lundkvist et al. (2001)
Latvia-9793	AJ319585	2A	2001	Human blood	Latvia	Lundkvist et al. (2001)
LU Dagmarsellen1	HM468142	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
LU Dagmarsellen2	HM468143	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
LU Dagmarsellen3	HM468144	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ML_M2_A104_1990	KC154199	2A	1990	Apodemus flavicollis	Austria: Kleinsemmering	Frey et al. (2012)
ML_M3_285_1990	KC154200	2A	1990	I. ricinus	Slovakia: Malacky	Frey et al. (2012)
ML_M5_CG/223_1990	KC154201	2A	1990	Myodes glareolus	Slovakia: Zahorska Ves	Frey et al. (2012)
ML_M9_114_1980	KC154202	2A	1980	I. ricinus	Slovakia: Plastovce	Frey et al. (2012)
N256	AF091014	2A	Unknown	I. ricinus	Minsk, Belarus	Ecker et al. (1999)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
NW_2A111- 120N_11	KC154193	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Neustadt/Waldnaab	Frey et al. (2012)
PA I	FJ360847	2A	2006	I. ricinus	Germany: Bavaria	Kupca et al. (2008)
PA II	FJ360848	2A	2006	I. ricinus	Germany: Bavaria	Kupca et al. (2008)
PA III	FJ360849	2A	2006	I. ricinus	Germany: Bavaria	Kupca et al. (2008)
PA_1R1-4N_11	KC154191	2A	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Passau	Frey et al. (2012)
Pan	AF091015	2A	1957	Human blood	Moscow, Russia	Ecker et al. (1999)
pool 2223	KC292219	2A	2011	tick	Germany: Bavaria	Klaus et al. (2012)
RO I	FJ360850	2A	2006	I. ricinus	Germany: Bavaria	Kupca et al. (2008)
Salem	EU106868	2A	?	brain tissue	Germany	Hotzel et al. (2007)
				Macaca sylvanus		
Salem	FJ572210	2A	?	?	Germany	Zoeller et al. (2008)
Saringe-2009	KC469073	2A	2009	I. ricinus	Sweden	Lindblom et al. (2013)
Savran_160	XXXXXXX*	2A	1989	I. ricinus	Ukraine	Yurchenko et al. (2013)
Scharl	AF091017	2A	1956	Human brain	Lower Austria, Austria	Ecker et al. (1999)
SH Stein am Rhein	HM468149	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
Simo-2	HQ228016	2A	2009	Myodes glareolus	Finland	Jaaskelainen et al. (2010)
Simo-38	HQ228014	2A	2009	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2010)
Simo-48	HQ228015	2A	2009	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2010)
Simo-5	HQ228017	2A	2009	Myodes glareolus	Finland	Jaaskelainen et al. (2010)
Simo-7	HQ228018	2A	2009	Myodes glareolus	Finland	Jaaskelainen et al. (2010)
Simo-9	HQ228019	2A	2009	Myodes glareolus	Finland	Jaaskelainen et al. (2010)
SO Oensingen1	HM468150	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
SO Oensingen2	HM468151	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
SO Oensingen3	HM468152	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
SZ Gersau	HM468155	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
T-133	JF501412	2A	1986	I. ricinus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T1354	EU872052	2A	?	?	Germany	Hoffmann et al. (2008)
T1401	EU872053	2A	?	?	Germany	Hoffmann et al. (2008)
T-155	JF501413	2A	1986	I. ricinus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-177	JF501411	2A	1986	I. ricinus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-239	JF501417	2A	1987	I. ricinus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-321	JF501418	2A	1987	I. ricinus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-717/III	JF501424	2A	1996	I. ricinus	Czech Republic: Chlum/Decina, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-718	JF501425	2A	1996	I. ricinus	Czech Republic: Chlum/Decina, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-721	JF501426	2A	1996	I. ricinus	Czech Republic: Chlum/Decina, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-721/III	JF501427	2A	1996	I. ricinus	Czech Republic: Chlum/Decina, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-730/I	JF501429	2A	1997	I. ricinus	Czech Republic: Nova Rice, South Moravia	Weidmann et al. (2011)
T-740	JF501430	2A	1997	I. ricinus	Czech Republic: Neznabohy, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-742	JF501431	2A	1997	I. ricinus	Czech Republic: Neznabohy, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-750/II	JF501432	2A	1997	I. ricinus	Czech Republic: Neznabohy, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-754/II	JF501433	2A	1997	I. ricinus	Czech Republic: Neznabohy, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
T-828	JF501434	2A	1999	I. ricinus	Czech Republic: Usti nad Labem, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T828/II	JF501435	2A	1999	I. ricinus	Czech Republic: Usti nad Labem, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-85	JF501414	2A	1986	I. ricinus	Czech Republic: Zlata Koruna, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
TBE 4387	x76607	2A	1982	Bank vole	Southern Slovakia	Labuda et al. (1994)
TG Frauenfeld	HM468157	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Lommis1	HM468158	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Lommis3	HM468160	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
Toro-2003	DQ401139	2A	2003	I. ricinus	Sweden: Toro	Melik et al. (2007)
Toro-2003	DQ401140	2A	2003	I. ricinus	Sweden: Toro	Johansson et al. (2009)
UR Schattdorf1	HM468168	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
UR Schattdorf2	HM468169	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
UR Silenen	HM468170	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
UR Sisikon1	HM468171	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
UR Sisikon2	HM468172	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
V-361	JF501422	2A	1989	Apodemus sylvaticus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
V-364	JF501423	2A	1989	Myodes glareolus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
VD Cudrefin	HM468173	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
VD Rances1	HM468174	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
VD Rances2	HM468175	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
VS Raron	HM468176	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
VS Salgesch	HM468177	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZG Steinhausen1	HM468178	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZG Steinhausen2	HM468179	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
ZH Elgg	HM468186	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Langnau a.A.1	HM468187	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Langnau a.A.2	HM468188	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Oberstammheim	HM468189	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Ruemlang	HM468190	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Unterengstringen	HM468192	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Zollikon1	HM468193	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Zollikon2	HM468194	2A	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
H-47	JQ654654	2B	2000	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-49	JQ654656	2B	2003	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-54	JQ654661	2B	2006	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-56	JQ654663	2B	2007	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-57	JQ654664	2B	2009	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-61	JQ654668	2B	2009	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
R-33	JQ654651	2B	2007	Apodemus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
T-15	JQ654647	2B	2006	Ixodes ricinus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
T-20	JQ654648	2B	2006	Ixodes ricinus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
T-23	JQ654649	2B	2007	Ixodes ricinus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
T-8	JQ654643	2B	2005	Ixodes ricinus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
TG Aadorf	HM468156	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Thundorf	HM468161	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Waengi1	HM468162	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Waengi2	HM468163	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Waengi3	HM468164	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Waengi4	HM468165	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Waengi5	HM468166	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
TG Waengi6	HM468167	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
ZH Aeugst a.A.1	HM468182	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Aeugst a.A.2	HM468183	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Bassersdorf1	HM468184	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZH Bassersdorf2	HM468185	2B	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
AM I	FJ360845	2C	2006	I. ricinus	Germany: Bavaria	Kupca et al. (2008)
AM II	FJ360846	2C	2006	I. ricinus	Germany: Bavaria	Kupca et al. (2008)
AS_1B376-385N_11	KC154192	2C	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Poppenricht	Frey et al. (2012)
AS33	GQ266392	2C	2005	I. ricinus	Germany: Amberg	Kupca et al. (2009)
SG Moerschwil1	HM468147	2C	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
SG Moerschwil2	HM468148	2C	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
T-10	JQ654645	2C	2006	Ixodes ricinus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
Lithuania-262	AJ414703	2D	2001	Human blood	Lithuania	Mickiene et al. (2001)
ZH RuetiZH	HM468191	2D	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
SZ Freienbach1	HM468153	2E	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
SZ Freienbach2	HM468154	2E	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
H-58	JQ654665	2F	2009	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-60	JQ654667	2F	2010	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
Ljub. I	AF091012	2F	1993	Human blood	Ljubljana, Slovenia	Ecker et al. (1999)
Ljubljana I	JQ654701	2F	1992	Human serum	Slovenia	Fajs et al. (2012)
OW Alpnach	HM468146	2F	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
R-30	JQ654650	2F	2007	Myodes glareolus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
R-37	JQ654652	2F	2008	Myodes glareolus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
T-12	JQ654646	2F	2006	Ixodes ricinus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
T-9	JQ654644	2F	2006	Ixodes ricinus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
280	EF113085	2G	2006	Unknown	Czech Republic	Ruzek et al. (2006)
282	EF113087	2G	2006	Unknown	Czech Republic	Ruzek et al. (2006)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Neudoerfl	TEU27495	2H	1971	I. ricinus	Neudoerfl, Austria	Mandl et al. (1988)
TG Lommis2	HM468159	2H	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
206	JF501438	2I	2000	I. ricinus	Czech Republic: Borovany, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
KrM 93	EU276109	2I	2007	Tick	South Korea	Yun et al. (2007)
KrM 93	HM535611	2I	2006	Apodemus agrarius	South Korea	Yun et al. (2010)
Latvia-8110	AJ319583	2J	2001	Human blood	Latvia	Lundkvist et al. (2001)
Latvia-8369	AJ319584	2J	2001	Human blood	Latvia	Lundkvist et al. (2001)
1025	JF501442	2Unique	2002	I. ricinus	Czech Republic: Borovany, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
760	JF501428	2Unique	1997	I. ricinus	Czech Republic: Neznabohy, North Bohemia	Weidmann et al. (2011)
8641	JF501406	2Unique	1977	I. ricinus	Czech Republic: Rabyne, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
9045	JF501409	2Unique	1978	I. ricinus	Czech Republic: Celina, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
AG Brittnau2	HM468124	2Unique	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
Est3476	DQ393776	2Unique	2000	Human blood	Estonia	Golovljova et al. (2004)
Est3476	GU183383	2Unique	2000	Human TBE case	Estonia	Uzcategui et al. (2012)
H-59	JQ654666	2Unique	2009	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
H-62	JQ654657	2Unique	2009	Homo sapiens	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
HA_2P1-10N_11	KC154194	2Unique	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Hauzenberg	Frey et al. (2012)
HB_203_11	KC154196	2Unique	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Heselbach	Frey et al. (2012)
HB_215_11	KC154197	2Unique	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Heselbach	Frey et al. (2012)
HB_222_11	KC154198	2Unique	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Heselbach	Frey et al. (2012)
Hypr	TEU39292	2Unique	1953	Human blood	Brno, Czech Republic	Wallner et al. (1996)
Joutseno	GU183381	2Unique	1960	mouse brain	Finland	Uzcategui et al. (2012)
K23	AF091010	2Unique	1975	I. ricinus	Karlsruhe, Germany	Ecker et al. (1999)
K23	AM600965	2Unique	1975	primary chicken embryo cells	Germany: Karlsruhe	Stadler (2007)



Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Kem I	AF091011	2Unique	1952	I. ricinus	Tatabanya, Hungary	Ecker et al. (1999)
KOR-07-046	FJ972625	2Unique	2007	Haemaphysalis longicornis nymph	Jeju Island, South Korea	Chae (2009)
KrM 213	EU276110	2Unique	2007	Tick	South Korea	Yun et.al. (2007)
KrM 213	HM535610	2Unique	2006	Apodemus agrarius	South Korea	Yun et al. (2010)
KrM 215	EU276111	2Unique	2007	Tick	South Korea	Yun et.al. (2007)
KrM 216	EU276112	2Unique	?	?	South Korea	Kim et al. (2006)
KrM 219	EU276113	2Unique	?	?	South Korea	Kim et al. (2006)
LU Ebikon	HM468145	2Unique	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
PA_1R3M_11	KC154190	2Unique	2011	I. ricinus	Germany: South-East Germany, Passau	Frey et al. (2012)
pool 2201	KC292217	2Unique	2011	tick	Germany: Baden-Wuerttemberg	Klaus et al. (2012)
pool 2215	KC292218	2Unique	2011	tick	Germany: Bavaria	Klaus et al. (2012)
R-42	JQ654653	2Unique	2007	Apodemus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
Stara Ves	AF091018	2Unique	Unknown	Unknown	Stara Ves, Croatia	Ecker et al. (1999)
T-3	JQ654642	2Unique	2005	Ixodes ricinus	Slovenia	Durmisi et al. (2012)
T-87	JF501415	2Unique	1986	I. ricinus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
T-94	JF501416	2Unique	1986	I. ricinus	Czech Republic: Hnevkovice, Central Bohemia	Weidmann et al. (2011)
V-352	JF501421	2Unique	1989	Apodemus sylvaticus	Czech Republic: Zdar Kaplice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
V540	JF501436	2Unique	1999	I. ricinus	Czech Republic: Boletice, South Bohemia	Weidmann et al. (2011)
ZG Steinhausen3	HM468180	2Unique	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZG Steinhausen4	HM468181	2Unique	2009	I. ricinus	Switzerland	Gaumann et al. (2010)
ZZ9	AF091020	2Unique	1985	I. ricinus	Zell/Ziller, Austria	Ecker et al. (1999)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
101	EU443259	3A	1990	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1047-10	KC417478	3A	2010	I. persulcatus	Russia: Irkutsk region	Adelshin et al. (2012)
1189	EF469750	3A	1995	lab mouse brain	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1203	JN936392	3A	1996	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1386	JN936395	3A	1997	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1427	EF469754	3A	1998	lab mouse brain	Novosibirsk region, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1486	EF469755	3A	1999	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1505	EF469756	3A	1999	lab mouse brain	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1526	EF469757	3A	1999	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1575	EF469759	3A	1999	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1577	EF469760	3A	1999	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1587	EF469761	3A	2000	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1618	EU443281	3A	2000	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1620	EF469762	3A	2000	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
1627	EU443282	3A	2000	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1636	EU443283	3A	2000	lab mouse brain	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1701	JN936407	3A	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
1725	JN936408	3A	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1731	JN936409	3A	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1751	JN936411	3A	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1819	JN936414	3A	2002	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
237	EF470570	3A	1988	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
2378	GQ423567	3A	2007	lab mouse brain	South-Western Siberia, Novosibirsk, Russia	Morozova et al. (2009)
2421	GQ423572	3A	2008	lab mouse brain	South-Western Siberia, Novosibirsk, Russia	Morozova et al. (2009)
2432	GQ423569	3A	2008	I. persulcatus	South-Western Siberia, Novosibirsk, Russia	Morozova et al. (2009)
2444	GQ423571	3A	2008	lab mouse brain	South-Western Siberia, Novosibirsk, Russia	Morozova et al. (2009)
2453	GQ423573	3A	2008	lab mouse brain	South-Western Siberia, Novosibirsk, Russia	Morozova et al. (2009)
2574	GU060548	3A	2009	I. persulcatus	South-Western Siberia, Novosibirsk region, Russia	Morozova et al. (2009)
2689	JQ693478	3A	2010	ixodid tick	Novosibirsk, Western Siberia, Russia	Tikhomirov et al. (2012)
3	GU143820	3A	2009	I. persulcatus	Russia, Ural, Chelyabinsk region	Morozova et al. (2009)
302	EU443262	3A	1988	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
396	DQ394880	3A	1981	I. persulcatus	Academgorodok outskirts, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2006)
396	EF467841	3A	1981	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
834-10	KC417477	3A	2010	I. persulcatus	Russia: Irkutsk region	Adelshin et al. (2012)
969	EU443258	3A	1994	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
983	EU443265	3A	1994	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
Ch111018-2010	JX315810	3A	2010	I. persulcatus	Russia, Chelyabinsk region	Kovalev et al. (2012)
Ch13247-2005	GU444175	3A	2005	I. persulcatus	Russia, Chelyabinsk region	Kovalev et al. (2009)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Chl5570-2005	GU444184	3A	2005	I. persulcatus	Russia, Chelyabinsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekaterinburg-338-09	GQ845429	3A	2009	I. persulcatus	Ural, Sverdlovsk region	Karan et al. (2009)
Ekaterinburg-35-8-06	FJ214122	3A	2006	I. persulcatus	Ekaterinburg, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-37-3-06	FJ214126	3A	2006	I. persulcatus	Ekaterinburg, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-421-09	GQ845421	3A	2009	I. persulcatus	Ural, Sverdlovsk region, Serov city	Karan et al. (2009)
Ekaterinburg-439-09	GQ845425	3A	2009	I. persulcatus	Ural, Sverdlovsk region	Karan et al. (2009)
Ekaterinburg-44-2-06	FJ214124	3A	2006	I. persulcatus	Ekaterinburg, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-56-03	FJ214127	3A	2003	I. persulcatus	Ekaterinburg, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Ekaterinburg-612-09	GQ845420	3A	2009	I. persulcatus	Ural, Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Chusovskoy lake	Karan et al. (2009)
Ekaterinburg-716-09	GQ845428	3A	2009	I. persulcatus	Ural, Sverdlovsk region, Shalinsk, Shabri	Karan et al. (2009)
Ekaterinburg-859-09	GQ845427	3A	2009	I. persulcatus	Ural, Sverdlovsk region, Nizhneserginsk, Ilmovka	Karan et al. (2009)
Ek1031-2008	GU444262	3A	2008	I. persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Verkhotur'e district	Kovalev et al. (2009)
Ek104-2009	JX315990	3A	2009	I. persulcatus	Russia: Alapaevsk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek106-2009	JX315976	3A	2009	I. persulcatus	Russia: Krasnoturinsk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek1066-2009	JX315987	3A	2009	I. persulcatus	Russia: Alapaevsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek1067-2009	JX315988	3A	2009	I. persulcatus	Russia: Alapaevsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek108-2009	JX315989	3A	2009	I. persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek1087-2010	JX315808	3A	2010	I. persulcatus	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekб11008-2010	JX315809	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб110-2008	GU444259	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekб11094-2010	JX315811	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2012)
Ekб11113-2010	JX315812	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Nizhnye Ser'gy, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб11-2007	GU444249	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nyzhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekб11413-2010	JX315813	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Beloyarsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб1149-2008	GU444269	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Serov district	Kovalev et al. (2009)
Ekб1151-2008	GU444270	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Serov district	Kovalev et al. (2009)
Ekб1153-2008	GU444271	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Serov district	Kovalev et al. (2009)
Ekб1160-2008	GU444272	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Serov district	Kovalev et al. (2009)
Ekб1163-2008	GU444273	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Serov district	Kovalev et al. (2009)
Ekб11706-2010	JX315814	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб118-2008	GU444260	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Revda district	Kovalev et al. (2009)
Ekб1192-2007	JX315776	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Sukhoi Log district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб1194-2010	JX315816	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб1198-2010	JX315817	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб12046-2011	JX315904	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб12-13-2006	GU444197	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb12-16-2006	GU4444198	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb12-17-2006	GU4444199	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Krasnoturinsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1219-2010	JX315818	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb12-2007	GU444250	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nyzhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekb12301-2011	JX315907	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Verkhnyaya Pyshma district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb12466-2011	JX315948	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Revda district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb125-2008	GU444261	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb125-2010	JX315820	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Asbest district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb13-2007	GU444251	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nyzhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekb13-23-2006	GU444201	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb13-23-2006	JX315759	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Polevskoi, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb135-2012	KC886325	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Asbest	Kovalev et al. (2013)
Ekb1365-1978	GU444150	3A	1978	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nizhnye Sergi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb13-8-2006	GU444200	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb14480-2011	JX315905	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb1449-1969	GU444151	3A	1969	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Pyshma district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1466-2012	KC886326	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2013)
Ekb15023-2012	KC886327	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2013)
Ekb1524-1975	GU444126	3A	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Pervoural'sk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb158-2010	JX315825	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb159-2010	JX315826	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb15941-2011	JX315906	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Kamensk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1627-1969	GU444155	3A	1969	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Shalya	Kovalev et al. (2009)
Ekb1653-1969	GU444130	3A	1969	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Talitsa district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1656-4-1969	JX315723	3A	1969	I.persulcatus	Russia: Talitsa, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1687-5-1969	JX315724	3A	1969	I.persulcatus	Russia: Pyshma district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb173-2011	JX315927	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Arti district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb175-2011	JX315928	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Arti district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb17605-2011	JX315940	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb176-1-2011	JX315945	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sukhoi Log district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb176-2-2011	JX315946	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sukhoi Log, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb17663-2011	JX315931	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Polevskoi, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb17-7-2006	GU444202	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb177-2011	JX315947	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sukhoi Log district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb177-2012	KC886329	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Beryozovskiy district	Kovalev et al. (2013)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb178-2011	JX315929	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Bogdanovich district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb182-2008	GU4444282	3A	2008	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Alapaevsk	Kovalev et al. (2009)
Ekb183-2007	GU4444241	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Pervoural'sk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb184-2009	JX315967	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1842-2006	GU4444214	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beryozovsk	Kovalev et al. (2009)
Ekb1874-2006	GU4444215	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1900-2010	JX315828	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1928-2010	JX315829	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb193-2007	GU4444226	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Bogdanovich district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1935-2010	JX315830	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1987-2007	GU4444221	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Karpinsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb200505-2005	GU4444186	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb2012-2007	GU4444252	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Revda district	Kovalev et al. (2009)
Ekb2016-2009	JX315969	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)
Ekb2017-1969	JX315725	3A	1969	Human blood	Russia: Tugulym, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb205-2009	JX315962	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb21011-2009	JX315973	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)
Ekb21012-2009	JX315974	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)
Ekb2122-2005	GU4444167	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekb213-2012	KC886330	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2013)



Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb2231-1969	GU444131	3A	1969	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Shalya district	Kovalev et al. (2009)
Ekb2238-2009	JX315978	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)
Ekb237-2011	JX315911	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Serov district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb2439-2009	JX315968	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)
Ekb2500-2005	GU444169	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb2517-2005	GU444170	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekb2519-2005	GU444171	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb2593-2005	GU444172	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb2681-2005	GU444173	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb270-2009	JX315971	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Sysert', Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb27-1-2007	JX315766	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Polevskoi district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb276-2012	KC886331	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Krasnouralsk district	Kovalev et al. (2013)
Ekb2880-2005	GU444174	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nev'yansk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb302-2008	GU444281	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Kushva district	Kovalev et al. (2009)
Ekb3039-2010	JX315845	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb3040-2010	JX315846	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb304-2009	JX315970	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Serov, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb307-2009	JX315961	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Serov, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb308-2009	JX315998	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Serov, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb312-2005	GU444164	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb312-2009	JX315965	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Beryozovskiy, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb314-2010	JX315850	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Severouralsk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb3174-2009	JX315963	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb322-2008	GU444278	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Asbest district	Kovalev et al. (2009)
Ekb322-2011	JX315941	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb33-2007	GU444232	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb346-2006	GU444203	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Rezh district	Kovalev et al. (2009)
Ekb346-2009	JX315997	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Revda, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb347-1978	GU444157	3A	1978	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb3495-1984	GU444128	3A	1984	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nyzhnye Sergi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb357-2005	GU339055	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert	Kovalev et al. (2009)
Ekb3590-1978	GU444133	3A	1978	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb360-2012	KC886334	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Serov district	Kovalev et al. (2013)
Ekb361-2012	KC886335	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Serov district	Kovalev et al. (2013)
Ekb370-2010	JX315852	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Verkhnyaya Salda, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb371-2010	JX315853	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Verkhnyaya Salda, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb3718-1977	GU444134	3A	1977	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Serov district	Kovalev et al. (2009)
Ekb37-1969	GU444145	3A	1969	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb3745-1968	JX3115719	3A	1968	Human blood	Russia: Nizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb382-2009	JX3115999	3A	2009	I.persulcatus	Russia: Serov, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb4083-1978	GU444135	3A	1978	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb41-00	GU444124	3A	?	Unknown	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekb410-2011	JX3115938	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Karpinsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb41-2007	JX3115768	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Polevskoi district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb42-2008	GU444257	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi	Kovalev et al. (2009)
Ekb4299-2011	JX3115954	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb43-2010	JX3115875	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb4337-2011	JX3115930	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb4397-2011	JX3115917	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb443-2011	JX3115919	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Beryozovskiy district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb4458-2005	GU444176	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beloyarsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb4469-2005	GU444178	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekb4471-2011	JX3115932	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb4630-1978	GU444125	3A	1978	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb47-2012	KC886336	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2013)
Ekb4801-2011	JX3115901	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb493-2011	JX3115950	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb4981-2011	JX3115918	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb5045-2005	GU444179	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Ber'yozovsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb51-1968	JX3115720	3A	1968	I.persulcatus	Russia: Nizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb51-2012	KC886337	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2013)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekб51-2-1968	JX315721	3A	1968	I.persulcatus	Russia: Nizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб5191-2005	GU444180	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Lyalya	Kovalev et al. (2009)
Ekб52-2011	JX315949	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб53-2012	KC886339	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2013)
Ekб5357-2005	GU444182	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Ber'yozovsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekб54-1-ENIIVI	GU444123	3A	?	Unknown	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekб54-2012	KC886340	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2013)
Ekб54-2-ENIIVI	GU444122	3A	?	Unknown	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekб5465-2005	GU444188	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beloyarsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekб55-2008	GU444258	3A	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekб5571-2005	GU444189	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekб56-2012	KC886341	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2013)
Ekб5632-2011	JX315914	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб58-2010	JX315876	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Kamensk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб611-2012	KC886343	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2013)
Ekб613-2010	JX315878	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Nizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб623-2012	KC886344	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2013)
Ekб629-2012	KC886345	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2013)
Ekб631-2012	KC886346	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2013)
Ekб698-2007	GU444228	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb7014-2009	JX315964	3A	2009	Human brain	Russia: Nizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb704-2006	JX315758	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Beryozovsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb7-2007	GU444245	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nyzhnyi Tagil	Kovalev et al. (2009)
Ekb78-2007	GU444239	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb785-2006	GU444205	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beryozovsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb80-1969	GU444154	3A	1969	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekb8-2007	GU444246	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nyzhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekb862-2005	GU444165	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Ber'yozovsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb862-2010	JX315884	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Sysert' District, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb867-2007	GU444229	3A	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb885-2005	GU444166	3A	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nizhnie Sergi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb888-2006	GU444208	3A	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Rezh district	Kovalev et al. (2009)
Ekb89-2011	JX315939	3A	2011	I.persulcatus	Russia: Kamensk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb9130118-2012	KC886348	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Kamensk-Ural'sk district	Kovalev et al. (2013)
Ekb9300466-2012	KC886350	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2013)
Ekb93-2010	JX315886	3A	2010	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb95-2012	KC886351	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2013)
Ekb96-2012	KC886352	3A	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2013)
EkbEgoshin-2009	JX315966	3A	2009	Human brain	Russia: Rezh, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
EkbZhigalina-2009	JX315995	3A	2009	Human brain	Russia: Tavda, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
IR99-2f7	AB049352	3A	1999	I. persulcatus	Irkutsk, Russia	Hayasaka et al. (2001)
IR99-2m7	AB049351	3A	1999	I. persulcatus	Irkutsk, Russia	Hayasaka et al. (2001)
Kemerovo-134-08	GQ845433	3A	2008	I. persulcatus	Russia, West Siberia, Kemerovo region, Prokopyevsk, Chistugash	Karan et al. (2009)
Kemerovo-167	GQ845431	3A	2008	I. persulcatus	Russia, West Siberia, Kemerovo region, Prokopyevsk, Chistugash	Karan et al. (2009)
Krg4023-2008	JX315788	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Kurgan region	Kovalev et al. (2012)
Kurgan-16-09	GQ845426	3A	2009	I. persulcatus	Ural, Kurgan region, Kataysk	Karan et al. (2009)
Kurgan-279-07	FJ214149	3A	2007	I. persulcatus	Kurgan, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Kurgan-280-07	FJ214152	3A	2007	I. persulcatus	Kurgan, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Kurgan-316-07	FJ214151	3A	2007	I. persulcatus	Kurgan, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Kurgan-371-07	FJ214150	3A	2007	I. persulcatus	Kurgan, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Kurgan-373-09	GQ845417	3A	2009	I. persulcatus	Ural, Kurgan region	Karan et al. (2009)
Omsk4009-2010	JX315861	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4036-2010	JX315865	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4044-2008	JX315797	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4048-2008	JX315798	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4049-2008	JX315801	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4051-2008	JX315799	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4052-2008	JX315803	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4056-2010	JX315868	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4066-2010	JX315869	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4075-2010	JX315873	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Perm7584-2011	JX315903	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Prm72884-2011	JX315910	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm72913-2011	JX315935	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm73275-2011	JX315937	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm74051-2011	JX315921	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm74305-2011	JX315955	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm74373-2011	JX315915	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm74500-2011	JX315936	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm74592-2011	JX315951	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm74880-2011	JX315912	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm75610-2011	JX315913	3A	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Tmn252-2005	GU444162	3A	2005	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Tmn3001-2007	JX315773	3A	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3002-2010	JX315833	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3011-2007	JX315780	3A	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3018-2009	JX315972	3A	2009	?	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3022-2010	JX315835	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3023-2010	JX315836	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3025-2008	GU444274	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Tmn3025-2010	JX315838	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3026-2010	JX315839	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3027-2010	JX315840	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3031-2008	GU444275	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Tmn3032-2010	JX315841	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3033-2010	JX315842	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3038-2008	GU444276	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Tmn3038-2010	JX315844	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3042-2009	JX316000	3A	2009	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3042-2010	JX315848	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Tmn3044-2010	JX315849	3A	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3-2007	GU444218	3A	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Tmn3282-2008	GU444283	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Tmn3313-2008	GU444285	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Tmn3501-2008	JX315787	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3504-2008	JX315790	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3505-2008	JX315791	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3506-2008	JX315792	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3510-2008	JX315793	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3511-2008	JX315794	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3512-2008	JX315795	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4003-2008	JX315802	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4004-2008	JX315804	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4006-2008	JX315805	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4008-2008	JX315806	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4009-2008	JX315807	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4010-2008	JX315800	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4025-2008	JX315789	3A	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn5-3-2007	GU444242	3A	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Zausaev	AF527415	3A	1985	Human brain	Novosibirsk, Russia	Gritsun et al. (1993)
1057	EU443271	3A2	1995	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1446	EU443280	3A2	1998	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1467	AY753582	3A2	?	Tick	Novosibirsk region, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2004)
1487	JN936399	3A2	1999	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1658	EF469763	3A2	2000	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)



Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
1746	JN936410	3A2	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1762	JN936412	3A2	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1763	JN936413	3A2	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1937	EF467846	3A2	1985	lab mouse brain	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
2452	GQ423570	3A2	2008	I. persulcatus	South-Western Siberia, Novosibirsk, Russia	Morozova et al. (2009)
2614	GU060546	3A2	2009	mouse brain infected with suspension from	Russia, South-Western Siberia, Novosibirsk region	Morozova et al. (2009)
348	EF470574	3A2	1988	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
662	EF470577	3A2	1992	lab mouse brain	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
755	EF469738	3A2	1992	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
902	EU443261	3A2	1994	lab mouse brain	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
92M	HM133640	3A2	2004	?	Mongolia	Khasnatinov, 2010
Kemerovo-67-08	GQ845432	3A2	2008	I. persulcatus	Russia, West Siberia, Kemerovo region, Prokopyevsk, Chistugash	Karan et al. (2009)
Siberian-KY09	HM641235	3A2	2009	I. persulcatus	Kyrgyzstan	Briggs et al. (2010)
Z22	EF566816	3A2	2005	I. persulcatus	Kemerovo, Siberia, Russia	Zoeller et al. (2007)
Ekb1055-2006	JX315741	3B	2006	I. persulcatus	Russia: Tavatui, Nvyansk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1146-2006	JX315742	3B	2006	I. persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb125-2007	GU444253	3B	2007	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekb1270-2006	JX315743	3B	2006	I. persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb14-1975	GU444139	3B	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1729-2006	JX315749	3B	2006	I.persulcatus	Russia: Dvurechensk, Sysert' district	Kovalev et al. (2012)
Ekb1735-2010	JX315827	3B	2010	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1924-2007	JX315771	3B	2007	I.persulcatus	Russia: Beloyarsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb2036-2006	JX315750	3B	2006	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb22-1975	GU444141	3B	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb260503-2005	JX315730	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Sysert', Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb26-1975	GU444142	3B	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb2886-2005	JX315731	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb2971-2005	JX315732	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb300505-2005	JX315733	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb300517-2006	JX315751	3B	2006	I.persulcatus	Russia: Verkh-Neivinsk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb326-2012	KC886333	3B	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Verkhnyaya Pyshma	Kovalev et al. (2013)
Ekb33-1975	GU444143	3B	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb4012-2005	JX315734	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Kolyutkino, Beloyarsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb4108-2005	JX315735	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Sysert', Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb42-1975	GU444148	3B	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb440-2006	JX315752	3B	2006	I.persulcatus	Russia: Vekhnaya Sysert', Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb4486-2005	JX315736	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb451-2005	JX315737	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekб5489-2005	JX3115738	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Beryozovskiy, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб554-2006	JX3115753	3B	2006	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)
Ekб604-2006	JX3115754	3B	2006	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб60617-2005	JX3115739	3B	2005	I.persulcatus	Russia: Sysert', Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб621-2010	JX3115880	3B	2010	I.persulcatus	Russia: Nizhnyi Tagyl, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб643-2006	JX3115756	3B	2006	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб7-1975	GU444137	3B	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekб847-2010	JX3115883	3B	2010	Human brain	Russia: Nizhnyi Tagyl, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб905-2006	JX3115761	3B	2006	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб9-1975	GU444138	3B	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Omsk4026-2009	JX3115979	3B	2009	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4017-2008	JX3115781	3B	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
745	EF470578	3C	1992	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
Ekб1032-2008	GU444263	3C	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Verkhotur'e district	Kovalev et al. (2009)
Ekб1038-2008	GU444264	3C	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Verkhotur'e district	Kovalev et al. (2009)
Ekб1039-2008	GU444265	3C	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Verkhotur'e district	Kovalev et al. (2009)
Ekб1040-2008	GU444266	3C	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Verkhotur'e district	Kovalev et al. (2009)
Ekб20-1975	GU444140	3C	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekб34-1975	GU444144	3C	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb40-1975	GU4444146	3C	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb41-1975	GU4444147	3C	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb432-1977	GU4444158	3C	1977	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb4591-2005	GU4444192	3C	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb532-1972	GU4444159	3C	1972	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Krg1088-2009	JX315977	3C	2009	I.persulcatus	Russia, Kurgan region	Kovalev et al. (2012)
Z 6	EF566817	3C2	2005	I. persulcatus	Kemerovo, Siberia, Russia	Zoeller et al. (2007)
Ekb4-2009	JX315986	3C3	2009	I.persulcatus	Russia: Pyshma district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3519-2008	JX315786	3C3	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
1528	EF469758	3D	1999	lab.mouse brain	Novosibirsk region, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
Ekaterinburg-153-09	GQ845418	3D	2009	?	Ural, Sverdlovsk region, Sisert, Kashino, Russia	Karan et al. (2009)
Ekaterinburg-27-11-06	FJ214123	3D	2006	I. persulcatus	Ekaterinburg, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Ekb131-2009	JX315980	3D	2009	I.persulcatus	Russia: Kamyshlov, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb140-2010	JX315821	3D	2010	I.persulcatus	Russia: Kamyshlov district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb143-2010	JX315822	3D	2010	I.persulcatus	Russia: Kamyshlov district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb146-2010	JX315823	3D	2010	I.persulcatus	Russia: Kamyshlov district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1656-7-1969	GU4444153	3D	1969	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Talitsa district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1956-2007	GU444220	3D	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beloyarsk district	Kovalev et al. (2009)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb2172-2005	GU444168	3D	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb263-2009	JX315985	3D	2009	I.persulcatus	Russia: Asbest, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb335-2009	JX315982	3D	2009	I.persulcatus	Russia: Kamyshlov, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb373-2010	JX315854	3D	2010	I.persulcatus	Russia: Kamyshlov district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb40-2009	JX315983	3D	2009	I.persulcatus	Russia: Kamyshlov, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb5-1-2006	GU444194	3D	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb5263-2011	JX315890	3D	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb5444-2005	GU444183	3D	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb788-2006	GU444206	3D	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beloyarsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekb9-2-2006	GU444195	3D	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Kamyshlov district	Kovalev et al. (2009)
Ekb9300115-2012	KC886349	3D	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2013)
Est54	DQ393773	3D	2000	I. persulcatus	Estonia	Golovljova et al. (2004)
Karelia-94	HM051173	3D	2006	?	Karelia, Russia	Jaaskelainen et al. (2010)
Kurgan-264-07	FJ214130	3D	2007	I. persulcatus	Kurgan, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Kurgan-269-07	FJ214129	3D	2007	I. persulcatus	Kurgan, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Kurgan-272-07	FJ214128	3D	2007	I. persulcatus	Kurgan, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Kurgan-273-07	FJ214131	3D	2007	I. persulcatus	Kurgan, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Latvia-1-96	AJ415565	3D	2001	Human blood	Latvia	Lundkvist et al. (2001)
Latvia-1-96	GU183382	3D	1996	Human TBE case	Latvia	Uzcategui et al. (2012)
Omsk4006-2010	JX315860	3D	2010	Dermacentor sp.	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Omsk4016-2010	JX3115862	3D	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4019-2010	JX3115864	3D	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4037-2010	JX3115866	3D	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4047-2008	JX3115783	3D	2008	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4069-2010	JX3115870	3D	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4071-2008	JX3115785	3D	2008	D.reticulatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4078-2010	JX3115874	3D	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Prm73904-2011	JX3115895	3D	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
TBEV-Estonia54	GU183384	3D	2000	I. persulcatus	Estonia	Uzcategui et al. (2012)
Tmn3024-2010	JX3115837	3D	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3258-2008	GU444286	3D	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Tmn9-2-2007	GU444244	3D	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Vologda-166-08	GQ845435	3D	2008	I. persulcatus	Russia, European part, North-West, Vologda	Karan et al. (2009)
Vologda-173-08	GQ845436	3D	2008	I. persulcatus	Russia, European part, North-West, Vologda	Karan et al. (2009)
Vologda-3-75	FJ214143	3D	1975	I. persulcatus	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Vologda-509-75	FJ214142	3D	1975	I. persulcatus	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Vologda-911-74	FJ214138	3D	1974	Human blood	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Vologda-Krash-08	GQ845438	3D	2008	brain tissue of deceased patient	Russia, European part, North-West, Vologda	Karan et al. (2009)
Yaroslavl-115-01	FJ214145	3D	2001	I. persulcatus	Yaroslavl, Central region, Russia	Karan et al. (2008)
Yaroslavl-140-98	FJ214146	3D	1998	I. persulcatus	Yaroslavl, Central region, Russia	Karan et al. (2008)
Yaroslavl-Aver-08	GQ845440	3D	2008	brain tissue of deceased patient	Russia, European part, Yaroslavl	Karan et al. (2009)
Yaroslavl-Bel-08	GQ845439	3D	2008	brain tissue of deceased patient	Russia, European part, Yaroslavl	Karan et al. (2009)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ek1148-2-2006	GU4444210	3E	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ek1361-2008	GU4444279	3E	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ek1362-2008	GU4444280	3E	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ek1365-2008	GU4444284	3E	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Tavda district	Kovalev et al. (2009)
Ek1KK-1968	JX315722	3E	1968	Cow blood	Russia: Nizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
127-10	KC417475	3F	2010	I. persulcatus	Russia: Irkutsk region	Adelshin et al. (2012)
542-10	KC417476	3F	2010	I. persulcatus	Russia: Irkutsk region	Adelshin et al. (2012)
Bsh2001-2009	JX315958	3F	2009	I.persulcatus	Russia, Bashkiria region	Kovalev et al. (2012)
Ekaterinburg-5-09	GQ845424	3F	2009	I. persulcatus	Ural, Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Sisert	Karan et al. (2009)
Ekaterinburg-992-09	GQ845419	3F	2009	I. persulcatus	Ural, Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Koltsovo	Karan et al. (2009)
Ek102-2012	KC886324	3F	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2013)
Ek11a-2007	JX315762	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Pyshma district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek122-2010	JX315819	3F	2010	I.persulcatus	Russia: Asbest district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek13578-2011	JX315897	3F	2011	I.persulcatus	Russia: Beryozovsk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek14474-2011	JX315916	3F	2011	I.persulcatus	Russia: Pervouralsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek16-2007	GU4444222	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ek1906-2007	GU4444219	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beryozovsk district	Kovalev et al. (2009)
Ek19-2007	GU4444230	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ek123-2007	JX315763	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Polevskoi district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb25125-2009	JX315960	3F	2009	Human blood	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)
Ekb254-2005	GU444163	3F	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Ekb26-2007	GU444231	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb275-2005	GU444190	3F	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Zarech'nyi	Kovalev et al. (2009)
Ekb32-2008	GU444254	3F	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb34-2008	GU444255	3F	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb35-2008	GU444256	3F	2008	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb405-2011	JX315956	3F	2011	I.persulcatus	Russia: Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb432-2011	JX315923	3F	2011	I.persulcatus	Russia: Asbest district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb44-2007	GU444235	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb51-2007	JX315764	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Polevskoi district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb5275-2005	GU444181	3F	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb54-2007	GU444236	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb55-2007	GU444237	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb67-2011	JX315926	3F	2011	I.persulcatus	Russia: Asbest district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb68-2011	JX315924	3F	2011	I.persulcatus	Russia: Asbest district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb77-2007	GU444238	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb81-2007	JX315765	3F	2007	I.persulcatus	Russia: Polevskoi district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb83-2011	JX315925	3F	2011	I.persulcatus	Russia: Kamensk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)



Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb91-I-2007	GU4444225	3F	2007	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Kamyshlov district	Kovalev et al. (2009)
Ekb92-2007	GU4444240	3F	2007	I. persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Kamensk-Ural'sk district	Kovalev et al. (2009)
Lesopark	GU121966	3F	1986	?	Russia, West Siberia	Kozlovskaya et al. (2009)
Omsk4014-2009	JX315959	3F	2009	D. reticulatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Prm73856-2011	JX315957	3F	2011	I. persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm7522-2011	JX315898	3F	2011	I. persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm7523-2011	JX315899	3F	2011	I. persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Tmn8-2007	GU4444243	3F	2007	I. persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
Kemerovo-49-08	GQ845430	3F2	2008	I. persulcatus	Russia, West Siberia, Kemerovo region, Prokopyevsk, Chistugash	Karan et al. (2009)
Kokkola-102	DQ451295	3G	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-118	DQ451296	3G	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-39	DQ451290	3G	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-79	DQ451291	3G	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-8	DQ451286	3G	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-81	DQ451292	3G	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-86	DQ451294	3G	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-9	DQ451287	3G	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Vologda-208-08	GQ845437	3G	2008	I. persulcatus	Russia, European part, North-West, Vologda	Karan et al. (2009)
1128	EU443274	3H	1995	lab mouse brain	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
942	EF469744	3H	1994	lab mouse brain	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
Aina	AF091006	3H	1963	Human blood	Irkutsk, Russia	Ecker et al. (1999)
Aina	JN003206	3H	1963	Homo sapiens	Russia	Kulakova et al. (2011)
Cht-22	JN003208	3H	2002	Homo sapiens	Russia	Romanova et al. (2011)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Cht-653	JN003207	3H	1995	Homo sapiens	Russia	Romanova et al. (2011)
Irkutsk-112-79	FJ214156	3H	1979	I. persulcatus	Irkutsk, East Siberia, Russia	Karan et al. (2008)
Irkutsk-12	JN003209	3H	2010	Homo sapiens	Russia	Kulakova et al. (2011)
Vasilchenko	L40361	3H	?			Gritsun et al. (2000)
Vasilchenko	M97369	3H	1969	Human blood	Novosibirsk, Russia	Gritsun et al. (1993)
Z 12	EF566814	3H	2005	I. persulcatus	Kemerovo, Siberia, Russia	Zoeller et al. (2007)
Z 14	EF566815	3H	2005	I. persulcatus	Kemerovo, Siberia, Russia	Zoeller et al. (2007)
Z 7	EF566818	3H	2005	I. persulcatus	Kemerovo, Siberia, Russia	Zoeller et al. (2007)
Zabaikalye 11-99	KC414090	3H	1999	Human brain	Russia: Zabaikalye	Sidorova et al. (2012)
Ekb11869-2011	JX315942	3I	2011	I. persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb314-2009	JX315992	3I	2009	I. persulcatus	Russia: Beryozovskiy, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb315-2009	JX315993	3I	2009	I. persulcatus	Russia: Beryozovskiy, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb316-2009	JX315994	3I	2009	I. persulcatus	Russia: Beryozovskiy, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb394-2010	JX315855	3I	2010	I. persulcatus	Russia: Beryozovsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb396-2010	JX315856	3I	2010	I. persulcatus	Russia: Beryozovsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb398-2010	JX315857	3I	2010	I. persulcatus	Russia: Beryozovsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb400-2010	JX315858	3I	2010	I. persulcatus	Russia: Beryozovsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb462-2011	JX315944	3I	2011	I. persulcatus	Russia: Beryozovsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb491-2011	JX315943	3I	2011	I. persulcatus	Russia: Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb669-2006	GU444204	3I	2006	I. persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beryozovsk district	Kovalev et al. (2009)
IR99-1m1	AB049348	3J	1999	I. persulcatus	Irkutsk, Russia	Hayasaka et al. (2001)
Kemerovo-K34-67	FJ214134	3J	1967	Human blood	Kemerovo, West Siberia, Russia	Karan et al. (2008)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Z 10	EF566813	3J	2005	I. persulcatus	Kemerovo, Siberia, Russia	Zoeller et al. (2007)
1130	EU443275	3K	1995	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1145	JN936391	3K	1995	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
980	JN936386	3K	1994	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
Ekaterinburg-14-5-06	FJ214125	3K	2006	I. persulcatus	Ekaterinburg, Ural, Russia	Karan et al. (2008)
Ek914-2011	JX315909	3K	2011	Human brain	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ek93-2011	JX315902	3K	2011	I. persulcatus	Russia: Kamensk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
1668	JN936403	3L	?	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1675	EF469764	3L	2001	I. persulcatus	Russia: West Siberia, Novosibirsk, Academgorodok	Tkachev et al. (2007)
1676	JN936404	3L	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1690	JN936405	3L	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1693	JN936406	3L	2001	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1699	EU443268	3L	2001	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1700	EU443284	3L	2001	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
Ek1632-2006	GU444211	3L	2006	I. persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
24	GU143822	3M	2009	I. persulcatus	Russia: Ural, Chelyabinsk region	Morozova et al. (1999)
Ek52-2012	KC886338	3M	2012	I. persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Yekaterinburg	Kovalev et al. (2013)
Tmn3163-2009	JX315975	3M	2009	I. persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3249-2008	GU444277	3M	2008	I. persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2009)
766	EF469739	3N	1992	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb4954-1984	GU444129	3N	1984	Human brain	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beloyarsk - district	Kovalev et al. (2009)
IR99-lm4	AB049349	3N	1999	I. persulcatus	Irkutsk, Russia	Hayasaka et al. (2001)
Ekb150-2010	JX315824	30	2010	I. persulcatus	Russia: Kamyshev district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb334-2009	JX315984	30	2009	I. persulcatus	Russia: Kamyshev, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb90-I-2007	GU444224	30	2007	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Kamyshev district	Kovalev et al. (2009)
Ekb13457-2011	JX315891	3P	2011	I. persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb14142-2011	JX315892	3P	2011	I. persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb79-2011	JX315893	3P	2011	I. persulcatus	Russia: Kamensk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Karelia-108	HM051174	3P	2006	?	Karelia, Russia	Jaaskelainen et al. (2010)
SPb10-2008	JX315782	3P	2008	I. persulcatus	Russia, Leningrad region	Kovalev et al. (2012)
Vologda-14-06	FJ214140	3P	2006	I. persulcatus	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Vologda-15-06	FJ214141	3P	2006	I. persulcatus	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Vologda-4-06	FJ214139	3P	2006	I. persulcatus	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Ekb1182-2007	JX315770	3Q	2007	I. persulcatus	Russia: Nizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1605-2006	JX315744	3Q	2006	I. persulcatus	Russia: Serov district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb725-2006	JX315747	3Q	2006	I. persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb752-2005	JX315727	3Q	2005	I. persulcatus	Russia: Kashino, Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb753-2006	JX315748	3Q	2006	I. persulcatus	Russia: Asbest, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
617-90	EU878283	3U	1990	I. persulcatus	Buryat Republic, Eastern Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008))
711-84	EU878281	3U	1984	Clethrionomys rufocanus	Buryat Republic, Eastern Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
740-84	EU878282	3U	1984	Clethrionomys rufocanus	Buryat Republic, Eastern Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
886-84	EF469662	3U	1984	C. rufocanus (wild rodents)	Irkutsk region, Russia	Karan et al. (1999)
1017	JN936387	3Unique	1994	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1047	JN936388	3Unique	1995	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1052	JN936389	3Unique	1995	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1143	JN936390	3Unique	1995	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
116-10	KC417474	3Unique	2010	I. persulcatus	Russia: Irkutsk region	Adelshin et al. (2012)
1212	JN936393	3Unique	1996	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1248	JN936394	3Unique	1996	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1252	DQ394879	3Unique	1982	I. persulcatus	Moshkovo outskirts, Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2006)
1259	EU443277	3Unique	1996	mouse brain	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1284	EU443278	3Unique	1996	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1346	EU443279	3Unique	1997	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1395	JN936396	3Unique	1997	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1430	JN936397	3Unique	1998	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1440	JN936398	3Unique	1998	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1441	EU443269	3Unique	1984	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
1527	JN936400	3Unique	1999	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1551	JN936401	3Unique	1999	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
1579	JN936402	3Unique	1999	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
16	GU143821	3Unique	2009	I. persulcatus	Russia, Ural, Chelyabinsk region	Morozova et al. (2009)
2033	JN936379	3Unique	1985	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
2045	JN936380	3Unique	1985	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
212	JN936381	3Unique	1988	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
228	DQ385498	3Unique	1981	I. persulcatus	Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2006)
228	EF467840	3Unique	1981	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
240	JN936383	3Unique	1988	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
2401	GQ423568	3Unique	2007	I. persulcatus	South-Western Siberia, Novosibirsk, Russia	Morozova et al. (2009)
323	EU443263	3Unique	1988	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
350	JN936384	3Unique	1988	I. persulcatus	Novosibirsk region, Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2011)
499	DQ394877	3Unique	1982	I. persulcatus	Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2006)
668	EU443260	3Unique	1992	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
691	DQ394878	3Unique	1982	I. persulcatus	Western Siberia, Russia	Tkachev et al. (2006)
691-1	EU443264	3Unique	1982	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2008)
919	EF469740	3Unique	1994	I. persulcatus	Academgorodok, Novosibirsk, West Siberia, Russia	Tkachev et al. (2007)
Altai731-2011	JX315887	3Unique	2011	I. persulcatus	Russia, Altai region	Kovalev et al. (2012)
Bashkiria-351-09	GQ845423	3Unique	2009	I. persulcatus	Russia, Bashkiria	Karan et al. (2009)
Chelyabinsk-357-09	GQ845422	3Unique	2009	I. persulcatus	Ural, Chelyabinsk region	Karan et al. (2009)
EK328	DQ486861	3Unique	1972	I. persulcatus	Estonia	Romanova et al. (2007)
Ekb10-2007	GU444248	3Unique	2007	I. persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nyzhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1068-2008	GU444267	3Unique	2008	I. persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1070-2008	GU444268	3Unique	2008	I. persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb11283-2011	JX315889	3Unique	2011	I. persulcatus	Russia: Polevskoi, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb1148-2006	GU444209	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1193-2010	JX315815	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia: Beloyarsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb12209-2011	JX315888	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia: Beloyarsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb12265-2011	JX315896	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia: Beloyarsk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb12-9-2006	GU444196	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb13581-2011	JX315900	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia: Beloyarsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb143-I-2007	JX315777	3Unique	2007	Human blood	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb170604-2005	GU444185	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1715-2006	GU444212	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb1715-2-2006	GU444213	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb17-2007	GU444223	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb174-2012	KC886328	3Unique	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Beryozovskiy district	Kovalev et al. (2013)
Ekb1766-1977	GU444152	3Unique	1977	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nizhny Sergi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb17698-2011	JX315953	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1852-2011	JX315894	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia: Nizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb1867-2006	JX315745	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb190507-2005	JX315726	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb197-I-2007	JX315772	3Unique	2007	Human blood	Russia: Kamyshev, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb200505-2-2005	GU444187	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Sysert' district	Kovalev et al. (2009)
Ekb200605-2005	JX315729	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Kosmakovo, Sysert' district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb2008-2006	GU444216	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekb206-2010	JX315831	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia: Irbit district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb207-2010	JX315832	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia: Irbit district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb2075-2006	JX315746	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Revda, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb208-2009	JX315991	3Unique	2009	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb2490-1969	GU444132	3Unique	1969	Human blood	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekb24974-2009	JX315996	3Unique	2009	Human blood	Russia: Sverdlovsk region +	Kovalev et al. (2012)
Ekb256-2007	GU444227	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekb27-2-2007	JX315767	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia: Polevskoi district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb2761-2005	GU444193	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Verkhnyaya Pyshma	Kovalev et al. (2009)
Ekb279-2012	KC886332	3Unique	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2013)
Ekb3102-1986	GU444127	3Unique	1986	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Beloyarsk	Kovalev et al. (2009)
Ekb320-2009	JX315981	3Unique	2009	I.persulcatus	Russia: Kamyshev, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb324-1975	GU444149	3Unique	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb324-2-1975	GU444156	3Unique	1975	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekb327-2010	JX315851	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia: Bogdanovich, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb35-2007	GU444233	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)



Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekб370-2011	JX315920	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia: Talitsa district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб39-2007	GU444234	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Polevskoi district	Kovalev et al. (2009)
Ekб431-2011	JX315922	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia: Asbest district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб4338-1978	GU444136	3Unique	1978	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nizhnye Sergi district	Kovalev et al. (2009)
Ekб4467-2005	GU444177	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Bogdanovich district	Kovalev et al. (2009)
Ekб447-2011	JX315952	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia: Beryozovsk district, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб467-2005	GU444191	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Novouralsk district	Kovalev et al. (2009)
Ekб606-2012	KC886342	3Unique	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2013)
Ekб612-2010	JX315877	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia: Hizhnyi Tagil, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб620-2010	JX315879	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia: Niznyi Tagyl, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб622-2010	JX315881	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia: Berkhnyaya Salda, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб637-2006	JX315755	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб643-1978	GU444160	3Unique	1978	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Baikalovo district	Kovalev et al. (2009)
Ekб650-2006	JX315757	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб663-2012	KC886347	3Unique	2012	I.persulcatus	Russia: Sverdlovsk region, Nizhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2013)
Ekб733-2006	JX315760	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб746-2005	JX315740	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Bogdanovich, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekб77-2005	GU444161	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekб790-2007	JX315769	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Ekb825-2010	JX315882	3Unique	2010	Human brain	Russia: Artyomovskiy, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb837-2006	GU444207	3Unique	2006	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Yekaterinburg district	Kovalev et al. (2009)
Ekb875-2010	JX315885	3Unique	2010	Human brain	Russia: Severouralsk, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb9-2007	GU444247	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia: Ural, Sverdlovsk region, Nyzhnyi Tagil district	Kovalev et al. (2009)
Ekb952-2005	JX315728	3Unique	2005	I.persulcatus	Russia: Yekaterinburg, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2012)
Ekb-Gorlin-2007	GU444217	3Unique	2007	Human brain	Russia: Ural, Sverdlovsk region	Kovalev et al. (2009)
Est3535	DQ393774	3Unique	2001	I. persulcatus	Estonia	Golovljova et al. (2004)
IR99-2f13	AB049353	3Unique	1999	I. persulcatus	Irkutsk, Russia	Hayasaka et al. (2001)
IR99-2m3	AB049350	3Unique	1999	I. persulcatus	Irkutsk, Russia	Hayasaka et al. (2001)
Kemerovo-8-11-05	FJ214135	3Unique	2005	I. persulcatus	Kemerovo, West Siberia, Russia	Karan et al. (2008)
Kokkola-25	DQ451288	3Unique	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-26	DQ451289	3Unique	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kokkola-84	DQ451293	3Unique	2006	I. persulcatus	Finland	Jaaskelainen et al. (2005)
Kolarovo-2008	FJ968751	3Unique	2008	Ixodes pavlovskiy	Kolarovo, Tomsk region, Russia	Chausov et al. (2009)
M2	JQ693480	3Unique	2011	ixodid tick	Moscow region, Russia	Morozov et al. (2012)
MucAr_M14/10_Mongolia	JF274481	3Unique	2010	I. persulcatus	Mongolia, Bulgan Aimak	Frey et al. (2011)
MucArM14-10	JQ429588	3Unique	2010	I. persulcatus	Mongolia	Frey et al. (2012)
Omsk4005-2010	JX315859	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4018-2010	JX315863	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4044-2010	JX315867	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4050-2008	JX315784	3Unique	2008	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4069-2-2010	JX315871	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Omsk4074-2010	JX315872	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia, Omsk region	Kovalev et al. (2012)
Prm71826-2011	JX315933	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)

Штамм	№ доступа в GenBank	Кластерон	Год выделения	Источник	Место выделения	Ссылка
Prm72318-2011	JX3115908	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Prm73547-2011	JX3115934	3Unique	2011	I.persulcatus	Russia, Perm' region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3017-2010	JX3115834	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3037-2010	JX3115843	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn3041-2010	JX3115847	3Unique	2010	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn4024-2008	JX3115796	3Unique	2008	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn5014-2007	JX3115774	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn5015-2007	JX3115775	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn5016-2007	JX3115779	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Tmn5018-2007	JX3115778	3Unique	2007	I.persulcatus	Russia, Tyumen region	Kovalev et al. (2012)
Vasilchenko	AF069066	3Unique	1969	Human blood	Novosibirsk, Russia	Gritsun et al. (1998)
Vasilchenko	AF069066	3Unique	1969	Human blood	Novosibirsk, Russia	Gritsun et al. (1998)
Volkhov-2-43	FJ214148	3Unique	1943	I. ricinus	Volkhov, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Vologda-157-08	GQ845434	3Unique	2008	I. persulcatus	Russia, European part, North-West, Vologda	Karan et al. (2009)
Vologda-227-07	FJ214153	3Unique	2007	I. persulcatus	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Vologda-365-75	FJ214136	3Unique	1975	I. persulcatus	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)
Ya 10/89	GU125719	3Unique	1989	?	?	Kozlovskaya et al. (2009)
Yar 114	EU444078	3Unique	2001	I. persulcatus	Yaroslavl region, Russia	Khasnatinov (2008)
Yar 46-2	EU444079	3Unique	2001	TBE patient	Yaroslavl region, Russia	Khasnatinov (2008)
Yar 48	EU444080	3Unique	2000	I. persulcatus	Yaroslavl region, Russia	Khasnatinov (2008)
Yar 71	EU444077	3Unique	1999	I. persulcatus	Yaroslavl region, Russia	Khasnatinov (2008)
Yaroslavl-2-80	FJ214144	3Unique	1980	I. persulcatus	Yaroslavl, Central region, Russia	Karan et al. (2008)
2530	GU060547	3Unique	2009	I.persulcatus	Russia, South-Western Siberia, Novosibirsk region	Morozova et al. (2009)
2730	JN993573	3Unique	2011	I. pavlovskiy	Russia: South-Western Siberia, Novosibirsk	Morozov et al. (2011)
Vologda-658-75	FJ214137	3Unique	1975	Human blood	Vologda, northwestern region, Russia	Karan et al. (2008)

## ПРИЛОЖЕНИЕ VII

Таблица 1

### Характеристика кластеронов ВКЭ-Ев и кластрон-специфичные аминокислотные замены

Кластерон	Прототипный штамм	№ доступа в GenBank	Кол-во штаммов (%)	dS*	122	128	130	167	169	189	206	234	239
<b>2A</b>	235	EF113081	135(70,1)	96	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>H</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>E</b>
<b>2B</b>	TG Waengi1	HM468162	12 (6,3)	14	.	.	<b>Y</b>	.	.	.	.	.	.
<b>2C</b>	AS33	GQ266392	5 (2,6)	6	.	<b>I</b>	.	.	.	.	.	.	.
<b>2D</b>	Lithuania-262	AJ414703	2 (1,0)	13	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>	.	.
<b>2E</b>	SZ Freienbach1	HM468153	2 (1,0)	0	.	.	.	.	.	<b>T</b>	<b>A</b>	.	.
<b>2F</b>	Ljub I	AF091012	2 (1,0)	12	.	.	.	.	.	.	.	<b>T</b>	.
<b>2G</b>	280	EF113085	2 (1,0)	0	.	.	.	.	<b>L</b>	.	.	.	.
<b>2H</b>	Neudoerfl	TEU27495	2 (1,0)	7	.	.	.	<b>I</b>	.	.	.	.	.
<b>2I</b>	206	JF501438	2 (1,0)	13	<b>G</b>	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>2J</b>	Latvia-8110	AJ319583	2 (1,0)	10	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>K</b>
<b>Уникальные</b>			25 (13,1)										
<b>Всего</b>			191 (100)										

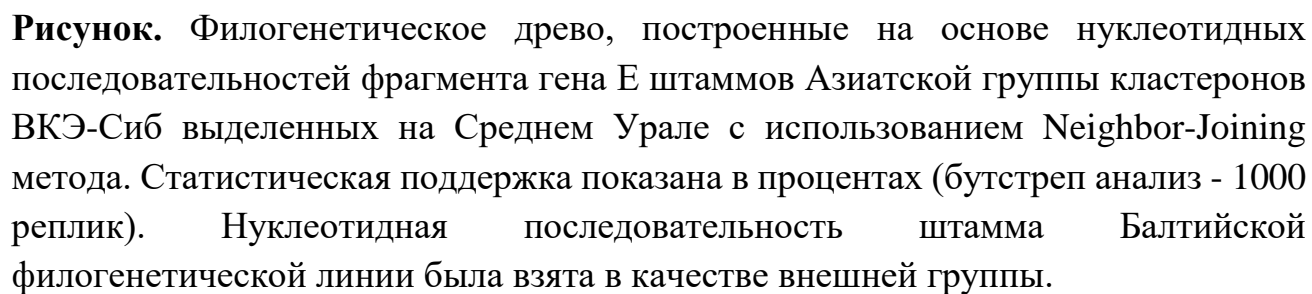
\* – Количество синонимических замен фрагмента гена E;

Таблица 2

### Характеристика кластеронов ВКЭ-Дв и кластрон-специфичные аминокислотные замены

Кластерон	Прототипный штамм	№ доступа в GenBank.	Количество штаммов (%)	dS*	122	130	137	153	163	171	175	228	237	246
<b>1A</b>	Dalnegorsk	FJ402886	43 (42.3)	89	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>A</b>
<b>1B</b>	Khabarovsk-Obor-4	FJ214111	8 (7.9)	18	.	.	.	<b>V</b>	.	.	.	.	.	.
<b>1C</b>	205	DQ989336	4 (4.0)	46	.	.	.	.	.	.	.	<b>R</b>	.	.
<b>1D</b>	N132	AF091013	3 (3.0)	0	.	<b>Y</b>	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>1E</b>	Ekb4100-1978	HM008981	5 (5.0)	1	.	<b>Y</b>	.	.	<b>V</b>	.	.	.	.	.
<b>1F</b>	Ekb73-1978	HM008978	3 (3.0)	0	.	.	<b>V</b>	.	.	.	.	.	.	.
<b>1G</b>	Kam586/97	AB237185	2 (2.0)	1	.	.	.	.	.	.	<b>A</b>	.	.	.
<b>1H</b>	Crimea	AF091008	2 (2.0)	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>V</b>
<b>1I</b>	DXAL5	AY178833	2 (2.0)	40	<b>G</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>1J</b>	Ekaterinburg-Vinokurov	FJ214120	2 (2.0)	0	.	.	.	.	.	.	.	<b>R</b>	<b>E</b>	.
<b>1K</b>	Sofjin	X07755	3 (3.0)	0	.	.	.	.	.	<b>R</b>	.	.	.	.
<b>Уникальные</b>			24 (23.8)											
<b>Всего</b>			101 (100)											

\* – Количество синонимических замен фрагмента гена E;



## ПРИЛОЖЕНИЕ IX

Таблица

Характеристика ITS2-аллелей клещей, собранных в Томской области (зона симпатрии *I. persulcatus* и *I. pавlovskyi*)

№	Образец	Клон	№ доступа в GenBank	Вид клеща	Год и мето сбора клеща
1	1140-13	ITS-1140-13-clone-29	KP241976	<i>I. persulcatus</i>	2013, Богашево
2		ITS-1140-13-clone-6	KP241977	<i>I. persulcatus</i>	
3	1188-13	ITS-1188-13-clone-1	KP241978	<i>I. pавlovskyi</i>	2013, Богашево
4		ITS-1188-13-clone-3	KP241979	<i>I. persulcatus</i>	
5	1225-13	ITS-1225-13-clone-35	KP241980	<i>I. pавlovskyi</i> *	2013, Богашево
6		ITS-1225-13-clone-4	KP241981	<i>I. persulcatus</i>	
7		ITS-1225-13-clone-41	KP241982	<i>I. pавlovskyi</i>	
8	1592-14	ITS-1592-14-clone-14	KP241983	<i>I. pавlovskyi</i>	2014, Коларово
9	1644-14	ITS-1644-14-clone-1	KP241984	<i>I. pавlovskyi</i>	2014, Казанка
10		ITS-1644-14-clone-4	KP241985	<i>I. persulcatus</i>	
11	1861-14	ITS-1861-14-clone-1	KP241986	<i>I. pавlovskyi</i>	2014, Коларово
12		ITS-1861-14-clone-5	KP241987	<i>I. persulcatus</i>	
13	1970-14	ITS-1970-14-clone-1	KP241988	<i>I. persulcatus</i>	2014, Коларово
14		ITS-1970-14-clone-12	KP241989	<i>I. persulcatus</i>	
15		ITS-1970-14-clone-13	KP241990	<i>I. pавlovskyi</i>	
16		ITS-1970-14-clone-14	KP241991	<i>I. pавlovskyi</i>	
17		ITS-1970-14-clone-18	KP241992	<i>I. pавlovskyi</i>	
18		ITS-1970-14-clone-7	KP241993	<i>I. persulcatus</i>	
19		ITS-1970-14-clone-9	KP241994	<i>I. persulcatus</i>	
20	2030-14	ITS-2030-14-clone-1	KP241995	<i>I. pавlovskyi</i>	2014, Коларово
21		ITS-2030-14-clone-10	KP241996	<i>I. persulcatus</i>	
22		ITS-2030-14-clone-11	KP241997	<i>I. pавlovskyi</i>	
23		ITS-2030-14-clone-2	KP241998	<i>I. persulcatus</i>	
24		ITS-2030-14-clone-20	KP241999	<i>I. persulcatus</i>	
25		ITS-2030-14-clone-4	KP242000	<i>I. pавlovskyi</i>	
26		ITS-2030-14-clone-43	KP242001	<i>I. persulcatus</i>	
27		ITS-2030-14-clone-5	KP242002	<i>I. pавlovskyi</i>	
28		ITS-2030-14-clone-6	KP242003	<i>I. persulcatus</i>	
29		ITS-2030-14-clone-7	KP242004	<i>I. pавlovskyi</i> *	
30		ITS-2030-14-clone-8	KP242005	<i>I. pавlovskyi</i> *	
31		ITS-2030-14-clone-9	KP242006	<i>I. persulcatus</i>	
32	2081-14	ITS-2081-14-clone-1	KP242007	<i>I. persulcatus</i>	2014, Казанка
33		ITS-2081-14-clone-32	KP242008	<i>I. persulcatus</i>	
34		ITS-2081-14-clone-8	KP242009	<i>I. pавlovskyi</i>	
35	2138-14	ITS-2138-14-clone-1	KP242010	<i>I. pавlovskyi</i>	2014, Казанка
36		ITS-2138-14-clone-32	KP242011	<i>I. pавlovskyi</i>	
37		ITS-2138-14-clone-4	KP242012	<i>I. persulcatus</i>	
38		ITS-2138-14-clone-6	KP242013	<i>I. persulcatus</i>	
39	2145-14	ITS-2145-14-clone-1	KP242014	<i>I. pавlovskyi</i>	2014, Казанка
40		ITS-2145-14-clone-5	KP242015	<i>I. persulcatus</i> *	
41	2203-14	ITS-2203-14-clone-6	KP242016	<i>I. persulcatus</i>	2014, Коларово

\* – необычные аллели

## ПРИЛОЖЕНИЕ X

Таблица

Характеристика ITS2-аллелей клещей, собранных в Эстонии (зона симпатрии *I. persulcatus* и *I. ricinus*)

№	Образец	Клон	№ доступа в GenBank	Вид клеща	Год и мето сбора клеща
1	720-1	720-1-06-clone2-2	KR136379	<i>I. persulcatus</i>	2006, LAEVA
2		720-1-06-clone3-2	KR136380	<i>I. persulcatus</i>	
3		720-1-06-clone4-2	KR136381	<i>I. persulcatus</i>	
4		720-1-06-clone5-2	KR136382	<i>I. persulcatus</i>	
5		720-1-06-clone6-2	KR136383	<i>I. persulcatus</i>	
6		720-1-06-clone7-2	KR136384	<i>I. persulcatus</i>	
7		720-1-06-clone8-2	KR136385	<i>I. persulcatus</i>	
8	870	870-06-clone2-3	KR136386	<i>I. persulcatus</i>	2006, LAEVA
9		870-06-clone3-3	KR136387	<i>I. persulcatus</i>	
10		870-06-clone4-3	KR136388	<i>I. persulcatus</i>	
11		870-06-clone5-3	KR136389	<i>I. persulcatus</i>	
12		870-06-clone1-1*	KR136396	<i>I. ricinus</i>	
13		870-06-clone1-3*	KR136397	<i>I. ricinus</i>	
14		870-06-clone2-1	KR136398	<i>I. ricinus</i>	
15	1512	1512-07-clone3-2	KR136393	<i>I. persulcatus</i>	2007, TUDULINNA HEJ
16		1512-07-clone4-2	KR136394	<i>I. persulcatus</i>	
17		1512-07-clone17-2	KR136390	<i>I. persulcatus</i>	
18		1512-07-clone19-2	KR136391	<i>I. persulcatus</i>	
19		1512-07-clone20-2	KR136392	<i>I. persulcatus</i>	
20		1512-07-clone1-2	KR136399	<i>I. ricinus</i>	
21		1512-07-clone2-2	KR136400	<i>I. ricinus</i>	
22		1512-07-clone5-2	KR136401	<i>I. ricinus</i>	
23		1512-07-clone6-2	KR136402	<i>I. ricinus</i>	
24		1512-07-clone7-2	KR136403	<i>I. ricinus</i>	
25	3717-3	3717-3-08-clone13-3	KR136395	<i>I. persulcatus</i>	2008. JÄRVSELJA
26		3717-3-08-clone8-3	KR136413	<i>I. ricinus</i>	
27		3717-3-08-clone9-3	KR136414	<i>I. ricinus</i>	
28		3717-3-08-clone10-3	KR136412	<i>I. ricinus</i>	
29	1605	1605-07-clone1-2	KR136405	<i>I. ricinus</i>	2007, TÄHTVERE
30		1605-07-clone2-2	KR136406	<i>I. ricinus</i>	
31		1605-07-clone3-2	KR136407	<i>I. ricinus</i>	
32		1605-07-clone4-2	KR136408	<i>I. ricinus</i>	
33		1605-07-clone5-2	KR136409	<i>I. ricinus</i>	
34		1605-07-clone6-2	KR136410	<i>I. ricinus</i>	
35		1605-07-clone7-2	KR136411	<i>I. ricinus</i>	
36	2017	2017-07-clone18-3	KR136404	<i>I. ricinus</i>	2007, TUDULINNA HEJ

\* - Химерные ITS2 аллели